



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

①2 **Offenlegungsschrift**
①0 **DE 195 45 130 A 1**

②1 Aktenzeichen: 195 45 130.9
②2 Anmeldetag: 4. 12. 95
④3 Offenlegungstag: 5. 6. 97

⑤1 Int. Cl.⁶:
G 01 N 31/20
G 01 N 31/16
G 01 N 31/22
G 01 N 33/53
G 01 N 27/416
B 01 L 3/02
G 01 N 33/50
C 12 Q 1/00
C 12 Q 1/26
C 12 Q 1/32
C 12 Q 1/42
// C12Q 1/54

I D S

DE 195 45 130 A 1

⑦1 Anmelder:
Cammann, Karl, Prof. Dr., 48155 Münster, DE

⑦4 Vertreter:
PFENNING MEINIG & PARTNER, 80336 München

⑦2 Erfinder:
gleich Anmelder

⑤6 Entgegenhaltungen:
DE 36 29 272 C2
DE 19 11 762 U1

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Verfahren und Vorrichtungen für ein modulares Mikrosystem für hochgenaue chemische Schnell-Analysen und Verfahren zur Herstellung

⑤7 Die Erfindung betrifft eine neue Klasse einfacher und preiswerter mikrochemischer Schnell-Tests in Form eines flexiblen, anwendungsorientierten, modularen Mikrosystems. Es beruht auf dem Prinzip einer orts aufgelösten, maßanalytischen, sog. inkrementellen Titration mit vorzugsweise optischer Äquivalenzpunkt-Indikation. Die Konzentrations-Ermittlung eines bestimmten Analyten geschieht mittels Parallel-Titrations (Reaktionen) in einem Titrations-Modul von Proben-Aliquoten aus einem Probennahme-Modul in mehreren getrennten oder verbundenen Mikro-Reaktionsräumen mit bekanntem Titer (Gehalt einer Maßlösung). Die aktuelle Probenkonzentration wird auf einer Skala abgelesen, an der zwischen zwei Mikro-Reaktoren oder im Mikro-Kanal der Äquivalenzpunkt überschritten wird und dadurch ein gut sichtbarer Farbumschlag eines analytselektiven Indikators stattfindet. Störanfällige Farbintensitäts-Messungen entfallen. Es ergibt sich so eine direkte Rückführbarkeit auf das Mol. Durch die Einbeziehung weiterer Vorbereitungs-, Funktions- oder Unit-Operations-Module mit oder ohne integrierten Reagenzien, Mikro-Bio-Reaktoren, Gas-Wäschern oder chromatographischen Trennzonen, etc., läßt sich mit dem erfindungsgemäßen "Labor auf dem Chip" prinzipiell jeder Analyt in flüssigen oder gasförmigen Proben (Passiv-Sammler-Prinzip) schnell und hochgenau ohne Labor bestimmen. Das Mikrosystem wird mittels massenproduktionstauglichen Präzisionstechniken unter Benutzung photolithographischer oder ...

DE 195 45 130 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Die Erfindung betrifft ein modular aufgebautes Mikrosystem für hochgenaue Schnell-Analysen. Das System hat eine geringe Ähnlichkeit mit einer maßanalytischen Tüpfelplatte mit sehr genau definierten Mikro-Kammern (Containments), bei der erfindungsgemäß die einzelnen Module mittels bekannter Methoden der hochpräzisen mikrosystemtechnologischen Massenproduktion hergestellt werden.

Die Erfindung stellt als "Labor auf dem Chip" ein echtes passives (d. h. kein stromverbrauchendes) Mikrosystem dar, das besonders durch alle Verfahren, deren Strukturen photolithographisch hergestellt werden, z. B. mittels der LIGA oder Silizium-Technologie, preiswert in Massen produziert werden kann. Bestimmte Varianten der erfindungsgemäßen Idee können auch durch die bekannten Techniken der Dickfilmtchnik (Siebdruck-Prinzip) auf Papier oder ähnliche Träger produziert werden. Der Aktuator stellt die Probe-Aliquotisierung über beliebige Mikro-Pipetten mit oder ohne Ventile im Probennahme-Modul dar, der Sensor wird aus der Serie der Mikro-Reaktoren mit dem Indikator und dem maßanalytischen, inkrementellen Äquivalenten im Titrations-Modul gebildet. Das System ergibt sich durch die Vereinigung beider und der Graduierung und/oder Skalierung in absoluten Äquivalenz-Einheiten mit der automatischen Rückführbarkeit auf das Mol.

Die Erfindung betrifft wegen der enormen Vielseitigkeit der verschiedenen maßanalytischen Verfahren und der außergewöhnlichen Variationsbreite der Kombinationsmöglichkeiten der Funktions-Module eine neue Klasse allgemein anwendbarer, hochgenauer, chemischer Schnell-Tests. Gemeinsames Merkmal ist ganz allgemein, daß die Stoffkonzentrations-Bestimmung in beliebigen Proben über konzentrationsabhängige geometrische Ausdehnungen oder mittels schnell und leicht feststellbarer, absoluter Äquivalenzmengen-Ermittlung auf oder in geeigneten Trägern durchgeführt wird, anstelle der sonst allgemein üblichen konzentrationsproportionalen Intensitätsmessung von markierten, stofferkennenden Zonen (Indikator).

Ein besonderer, gemeinsamer Vorzug der verschiedenen und äußerst zahlreichen Ausführungsformen der Erfindung ist, daß zur Ermittlung der der betreffenden Analytkonzentration äquivalenten Reagenzmenge (chemisch stabiler maßanalytischer Titrator) nur eine Ortsbestimmung einer leicht feststellbaren (vorzugsweise optischen) Änderung eines geeignet gewählten Indikators (Farbumschlag) auf einem entsprechend skalierten Träger notwendig ist.

Es handelt sich bei dieser Erfindung auch um eine neue Generation von rationell zu fertigenden, absolut messenden Teststreifen, -röhrchen, Passiv-Sammlern mit integrierter Quantifizierung oder ähnlichem. Die Erfindung führt im Prinzip eine maßanalytische Titration im sog. Titrations-Modul über eine Serie von Mikro-titrations in Mikro-Reaktionskammern durch, wobei der Äquivalenzpunkt entweder bei einem konstanten Mikro-Reaktor-Titer pro Mikro-Titrations-Raum durch eine im Probennahme-Modul genau abgemessene aber variable Probenmenge oder bei konstanten Proben-Aliquoten pro Mikro-Reaktions-Raum durch Variation des Reagenz-Titers von Mikro-Reaktor zu Mikro-Reaktor eingestellt wird. Zur Erhöhung des dynamischen Einsatzbereiches (erfaßbarer Konzentrationsbereich) kann auch beides, das Proben-Aliquot in den Mikro-Reaktoren und die dort zur Umsetzung verwendete Reagenz-

menge gleichzeitig und gegen läufig verändert werden.

Die Anzahl der für den Schnell-Test erforderlichen Mikro-Reaktoren hängt vom betreffenden Anwendungsfall, dem Erfassungsbereich und der gewünschten Genauigkeit ab. So genügt beispielsweise zur Feststellung einer Grenzwert-Überschreitung prinzipiell eine einzige Proben-Aliquotisierung und ein einziger Mikro-Reaktor mit einer dem betreffenden Grenzwert entsprechenden Äquivalenzmenge des Titrators. Tritt in diesem Mikro-Reaktor eine Umfärbung des analytselektiven Indikators auf, wurde in der Probe der Grenzwert überschritten. Da dies jedoch wegen der Miniaturisierung zu unhandlich kleinen Schnell-Test-Vorrichtungen führt, soll erfindungsgemäß eine Grenzwert-Kontrolle durch leicht mögliche Mehrfachbestimmungen erfolgen. Um dazu einen evtl. möglichen systematischen Fehler (z. B. Staubkorn oder Luftblase in der Probenahme-Pipette) zu verringern, wird erfindungsgemäß sowohl das Proben-Aliquot als auch der Probennahme-Zeitraum gering geändert, was zu entsprechenden stöchiometrischen Änderungen des Titors in den entsprechend vorbereiteten Mikro-Reaktoren führt. Eine statistisch sichere Grenzwert-Überschreitung liegt nur dann vor, wenn alle Reaktoren einen Indikator-Umschlag anzeigen. Diese Redundanz erhöht die Zuverlässigkeit des Schnelltests außerordentlich ohne daß der analytische Aufwand und der Chemikalien-Abfall entsprechend ansteigt.

Alternativ sind natürlich auch Einsatzgebiete denkbar, in denen es beispielsweise analytisch chemisch genau darauf ankommt, untere und obere Grenzbereiche mit erhöhter Genauigkeit zu erfassen (z. B. biologische Streubreite bei medizinischen Diagnosen). Hier kann man erfindungsgemäß die beiden Grenzkonzentrations-Bereiche durch verhältnismäßig zahlreichere Mikro-Reaktoren mit feinerer Skalierung überstreichen. Auch hier erhöht die analytische Redundanz die Zuverlässigkeit von Schnell-Tests erheblich, so daß sie in Bereiche der Präzisions-Analytik hineinreichen und damit einem Bedürfnis entgegenkommen.

Die vorliegende Erfindung, die zu einer neuen Klasse von Schnell-Tests führt, löst auch das generelle, schwierige Problem aller sog. relativen Analysenverfahren und klassischer Schnell-Tests, die mittels einer störanfälligen Signal-Intensitäts-Messung durchgeführt werden, weil erfindungsgemäß nur noch eine leicht feststellbare Veränderung eines geeigneten Indikators oder Anfang und Ende einer markierten Zone bzw. eine analytrelevante Markierung von einem Untergrund in oder auf einem Träger zu unterscheiden sind. Dadurch werden erstmals kalibrationsfreie, absolut messende Schnelltests möglich, deren Genauigkeit nur von der Wahl der graduellen Titrationsmittel- Dosierung und/oder Proben-Aliquotisierung pro Mikro-Reaktor abhängt. Da die Schärfe der Erkennung eines Indikator-Umschlagpunktes bei der Maßanalyse bekanntlich leicht 0,1% Relativ-Prozent vom Äquivalenzvolumen ausmacht, lassen sich erfindungsgemäß extrem genau messende Meßsysteme aufbauen, wenn beispielsweise 1000 Mikro-Reaktoren in geeigneter Anordnung auf einem geeigneten Träger untergebracht werden und eine ganze Konzentrationsdekade des Analyten mit gleicher Genauigkeit erfaßt werden muß.

Der Stand der Technik auf dem Gebiet der sog. naß-chemischen Analyse ist, bezogen auf die absoluten Mengen der miteinander reagierenden Stoffe (Analyt mit Standardlösung), nahezu der gleiche wie vor 100 Jahren, als beispielsweise die Maßanalyse als eine absolute Be-

stimmungsmethode eingeführt wurde. Bei den sog. titrimetrischen Verfahren (Säure-Base-, Redox-, Fällungs-, Komplex-, Assoziations-, Affinitäts-, etc. Titration) werden immer noch Volumina von i.d.R. 10 bis 100 mL bearbeitet und inzwischen auch mittels automatischer Titratoren mit integrierter Auswertungssoftware titriert. Da die Menge des zugesetzten Reagenzes (Titrator) durch das Volumen und den sog. Titer gegeben ist, muß die vorliegende Probenmenge in Abhängigkeit von der Analytkonzentration unterschiedlich dosiert werden, um den volumenmäßigen Verbrauch an Reagenz in einem durch die Dosiergenauigkeit limitierten Bereich zu halten. Üblicherweise sollten die zu Analytkonzentrationen bei einer titrimetrischen Analyse innerhalb einer Dekade liegen. Dies erfordert bei der Probenvorbereitung u. U. entsprechende Verdünnungsschritte.

Dieser Stand der Technologie bei der naßchemischen Maßanalyse produziert bei Serienanalysen eine entsprechend große Menge an Abfall, der je nach der Umweltrelevanz der Probe, des Reagenzes oder der Äquivalenzpunkterkennungs-Indikatoren oder sonstiger Hilfsstoffe als Sondermüll deklariert werden muß. Bei den weltweit täglich durchgeführten über 100 Millionen chemischen Analysen werden nicht wenige so durchgeführt und belasten daher die Umwelt. Ein besonders drastisches Beispiel ist die laut Wasserabgabengesetz vorgeschriebene Bestimmung des sog. chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB-Wert), ein operativ definierter Parameter. Hier wird nach einem DIN-Verfahren bestimmt, wieviel Stoffe in einer Probe sind, die durch eine heiße, saure Dichromat-Standardlösung in einer bestimmten Zeiteinheit oxidiert werden. Dazu muß der Überschuß des Oxidationsmittels auch nach der Bestimmung erhalten bleiben, d. h. es muß das hochtoxische Chromat entsorgt werden. Bei einer zu hohen Chloridkonzentration muß zur Bindung dieses Anions, das natürlich vom Chromat auch oxidiert wird aber keine organische Belastung darstellt, die man eigentlich dadurch erfassen möchte, ein Quecksilbersalz als-Chloridfänger hinzufügen. Dies alles läuft mit Probenmengen von 20 mL und Totalvolumina zwischen 30 und 100 mL bei Konzentrationen entsprechend 0,1 normaler Standardlösungen ab, was pro Analyse zu Milligramm-Mengen an Abfall führt. Erfindungsgemäß wird bei gleichbleibender Genauigkeit und sogar verkürztem Zeitaufwand die Abfallmenge um den Faktor > 1000 (!) reduziert.

Bei vielen klassischen Analysen, die inzwischen aus Gründen einer stringenteren Umweltpolitik erforderlich werden, wird der Informationsgewinn durch eine teilweise katastrophale Umweltbelastung mehr als kompensiert.

Allgemein kann festgestellt werden, daß einer generellen Miniaturisierung der klassischen Maßanalyse praktische Grenzen gesetzt sind. Der Umgang mit graduerten Volumenmeßgefäßen unter 1 mL ist nicht einfach und die derzeitigen Pipetten im Mikroliterbereich haben zu große Fehler und sind entsprechend aufwendig konstruiert. Bei der optischen Bestimmung des Äquivalenzpunktes müssen entsprechend kleine Strahlenquerschnitte verwendet werden, was zu apparativen Problemen bezüglich des Streulichtanteils führt.

Weil diese klassische Maßanalyse bei der Verwendung geeigneter Titratoren (Urtiter- Substanzen) eine absolute Bestimmungsmethode ist, die keiner Eichung mittels künstlicher oder natürlicher Standards (zertifizierte Standardreferenzmaterialien) bedarf, wird sie generell auch zur Kontrolle beliebiger Eich- oder Kalibrierungslösungen eingesetzt. Demgegenüber bestimmt

man die meisten Analyte anorganischer wie organischer Art durch sog. Relativ-Verfahren, die genau kalibriert werden müssen.

Bei fast allen analytisch-chemischen Relativ-Methoden wird die Intensität eines bestimmten Analysensignals (elektromagnetische Strahlung, elektrischer Strom, Widerstand oder Potential, sonstiges analytproportionales Sensor oder Detektorsignal) gemessen und mit dem einer Vergleichsprobe mit bekanntem Gehalt verglichen. Der Stand der Technik ist, daß bisher lediglich der letzte Schritt einer chemischen Analyse, den der Vermessung der Intensität eines Analysensignals; durch die apparativen Entwicklungen entscheidend verbessert werden konnte. Natürlich gibt es vor allem im klinischen Bereich mehr oder weniger große Automaten, die eine komplette chemische Naßanalyse vollautomatisch durchführen. Entsprechende Entwicklungen haben die seit den 60er Jahren bekannte Technikon-Auto-Analyzer Methode, die durch einen mit einem gasförmigen Zwischenraum segmentierten Probenstrom charakterisiert ist, verbessert.

Eine weitere Entwicklung hat versucht, das sog. Probenhandling zu vereinfachen und die Routine-Analytik zu automatisieren. Dies ist die Fließ-Injektionsanalyse (FIA, [E.H. Hansen, International Laboratory Vol. 15, No. 8, S. 14, 1986]), die analog dem Technikon-Auto-Analyzer System funktioniert, aber auf einen segmentierten Probenfluß verzichtet. Hier dosiert ein automatisches Probenahmeventil (Probenschleife) eine bestimmte Volumenmenge an Probe in einen Strom einer geeigneten Träger- oder Transportflüssigkeit (Carrier-Solution) der die Probe dann mit oder ohne Reaktions- oder Mischkammern mit allen erforderlichen Reagenzien vermischt und an einen Detektor vorbeiströmen läßt. Aus der Höhe oder Fläche eines dort erzeugten Analyt-Signal-Peaks wird dann die unbekannte Konzentration errechnet. Der Vorteil gegenüber den segmentierten Verfahren liegt darin, daß man durch die gewünschte Diffusion und Vermischen des Probensegments mit der Transportflüssigkeit beliebige Konzentrationsgradienten (sprich Verdünnungen) erzeugen kann.

Eine weitere Entwicklung auf dem Gebiet der naßchemischen Analyse sind entsprechende, mikroprozessor-gesteuerte Tischroboter-Systeme, die lediglich die Laborantentätigkeit automatisch erledigen.

Allen bekannten Systemen, die die naßchemische Analyse nach beliebigen Verfahren, Methoden oder Techniken automatisieren, liegt der Nachteil des großen Aufwandes und des relativ großen Reagenzienverbrauchs zugrunde. So sind beispielsweise die Automaten für die klinische Analyse komplizierte und entsprechend teure Gebilde, die einen entsprechend großen Stellplatz erfordern und auch eine beachtliche Menge an elektrischer Anschlußleistung benötigen. Als eigenständiger Bereich hat sich bei den Schnell-Methoden auch der der Test-Kits etabliert. Hier wurden zumeist tragbare Reagenzien-Kits entwickelt, die durch Vermischen mit einem Proben-Aliquot im Milliliter-Bereich und zumeist photometrischer Auswertung schnelle Vor-Ort-Analysen ermöglichen sollen. Allen Systemen gemeinsam ist aber der Nachteil, daß die vermessenen Proben in vielen Fällen Sondermüll darstellen und nicht im Mikroliterbereich anfallen. Für den letzteren Bereich kommen zwar sog. p-TAS (Mikro-Total-Analysen-Systeme) Entwicklungen in Frage, die aber noch im Entwicklungsstadium sind. Selbst wenn diese extreme Miniaturisierung der klassischen Analytik kommerziell erhältlich sein würde, ist der Aufwand wegen der erforder-

derlichen Mikropumpen und Signal-Meßeinrichtungen doch erheblich und führt zu keinen preiswerten Geräten.

Als Antwort auf diese gravierenden Nachteile der klassischen Analytik entwickelte sich in den letzten Jahren als Schnell-Test die Alternativmethode der sog. Trockenchemie (Oswald Sonntag: Trockenchemie: Analytik mit trägergebundenen Reagenzien, Thieme-Verlag, Stuttgart 1988) mit all ihren Varianten. Hier wurde versucht, die Probenvorbereitung, die Matrixabtrennung und die selektive Anfärbung mit einem speziellen, den Analyten erkennenden Reagenz auf einen mehr oder weniger planaren Träger aus Papier oder Kunststoff oder dergl. zu platzieren. Dies wird mit Hilfe entsprechender, unterschiedlicher Schichten mit immobilisierten Reagenzien oder Reagenzmischungen erreicht. In der medizinischen Schnellanalytik verwendet man häufig Teststreifen, bei denen ein oder mehrere Testfelder auf einem Kunststoffstreifen angebracht sind. Diese Teststreifen werden überwiegend visuell durch Vergleich der Reaktionsfarbe der Testfelder mit einer Farbskala, die häufig auf dem Etikett der Aufbewahrungsbehälter für diese Teststreifen angebracht sind, ausgewertet. Für die Referenz-Farbskala müssen dann aufwendige und lichtechte Farbdruckverfahren angewandt werden.

Die Teststreifen erfordern für den Anwender nur ein einfaches Eintauchen in die Probe und eine Konzentrationsablesung anhand einer Färbung oder einer Farbinintensität die mit dem bloßen Auge geschehen kann. Entsprechende Teststreifen gibt es inzwischen für eine Vielzahl von Analyten im Bereich der Medizin, des Umweltschutzes der Produktionskontrolle usw. Problematisch ist bei den traditionellen Teststreifen, daß die Zeitspanne des Eintauchens und die Art des Herausnehmens durch Abstreifen überschüssigen Probenvolumens genau vorgeschrieben ist und eingehalten werden muß. Das jeweils analysierte Proben-Aliquot wird durch die Verwendung eines flüssigkeitsaufsaugenden Materials bestimmt. Diese Art ist nicht sehr genau; weshalb man auch nur von halbquantitativen Ergebnissen spricht. Ebenso ist die visuelle Analyse nicht standardisiert. Eine Reihe von Variablen kann die Qualität der Resultate beeinflussen (W. Majunke, U. Watterodt, R. Proetzsch, G. Brillinger, Analytiker Taschenbuch Band 5, S. 161, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1985). Unterschiedliche Beleuchtungsverhältnisse, störende Eigenfarben der Proben, unterschiedlich genaues Einhalten der Ablesezeiten und individuell unterschiedliches Farbumscheidungsvermögen ergeben weitere Fehlermöglichkeiten, die einem zuverlässigen Schnelltest im Wege stehen.

Objektiver ist zwar eine Auswertung über ein entsprechendes Reflexionsphotometer bringt aber wegen der individuell stets möglichen Beeinflussung der Probenahme und Handhabung nicht entscheidend genauere Ergebnisse. Wenn die Teststreifen zu lange eingetaucht werden, verlieren sie ihre speziellen analyt-selektiven Reagenzien in die Probe und liefern falsche Ergebnisse. Ist die Rundung des Becherglasrandes zur Abstreifung zu stark, bleibt auch mehr Probe auf dem Teststreifen als einkalibriert wurde. Ebenso kann ein einfaches Abwischen mit anderen Hilfsmitteln schlecht standardisiert werden. Teststreifen für eine instrumentelle Auswertung haben ein Testfeld mehr als die, die visuell abgelesen werden. Das sog. Kompensationsfeld ist reagenzienfrei und besteht aus einem speziellen weißen Papier. Es wird durch eine mögliche Eigenfarbe der

Probe entsprechend angefärbt. Bevor das optische System die einzelnen Testfelder auswertet, mißt es die Reflexionswerte dieses Kompensationsfeldes und speichert einen Referenzwert, um damit die Eigenfärbung automatisch zu kompensieren.

Das weitverbreiteste Beispiel für diese Analysetechnik ist die Messung des Blutzucker-Gehaltes. Hier wird ein Tropfen Kapillarblut (aus einer kleinen Wunde) auf die Oberfläche des Teststreifens aufgebracht. Das Vollblut wird auf dem mehrlagigen Teststreifen filtriert, von den roten Blutbestandteilen getrennt und dann räumlich getrennt der Analyt Glucose mit immobilisierter Glucoseoxidase katalytisch zu Gluconsäure und Wasserstoffperoxid umgesetzt. Hochmolekulare und zelluläre Bestandteile bleiben zurück und werden nach Ablauf der Einwirkzeit (1–2 min) vom Testfeld abgewischt. Das gebildete Wasserstoffperoxid ist proportional der Glucosekonzentration und wird optisch dadurch angezeigt, daß es das Oxidationsmittel für eine Reaktion zwischen zwei organischen Molekülen darstellt, die dann eine proportionale Menge eines grün blau gefärbten Azofarbstoffes bilden. Hierbei geschieht der Probentransport im Unterschied zu den obigen Verfahren mittels der Kapillarwirkung der Trägermaterialien. Im Prinzip ist dadurch die Messung des Blutzuckergehaltes so einfach wie eine pH-Wert-Messung mittels eines Indikatorpapiers geworden, so daß auch Laien, also der Patient mit Diabetis, eine Selbstkontrolle durchführen kann.

Alle Teststreifen, -stäbchen oder -röhrchen, die eine Vielzahl von für die Umwelt oder Klinik wichtige Analyte auf Basis diese sog. Trockenchemie ohne erneute Kalibrierung erfassen, leiden aber unter noch weiteren entscheidenden Nachteilen:

Im Prinzip verläuft die Stofferkennung durch eine geeignete, gut wahrnehmbare Markierung des Analyten durch geeignete Hilfsmittel (Reagenzien). In den meisten Fällen werden bei einer quantitativen, instrumentell-analytischen Methode in der Regel analytkonzentrations-abhängige Farb-Intensitäts-Signale mit Hilfe verschiedenster physikalisch-chemischer Wechselwirkungen ausgemessen. Auch bei der Entstehung von Mischfarben spielen die unterschiedlichen Intensitäten der Grundfarben eine entscheidende Rolle. Nachteilig bei allen Stoffkonzentrationsbestimmungen, die über die Messung einer bestimmten Signal-Intensität verläuft, sind die verschiedensten Störungen, die damit einhergehen. Unabhängig von der Art des eigentlichen Meßsignals (Intensität von elektromagnetischer Strahlung, elektrischer Potentiale/Ströme/Leitfähigkeit, magnetischer oder elektrischer Felder, usw.) führen Veränderungen der Anregungs- und Ausgangssignalstärke und/oder probenmatrixbedingte Störfaktoren bei der analytspezifischen Wechselwirkung mit diesen Anregungsenergien zu Fehlmessungen. Auch muß i.d.R. die Probe in ein entsprechendes Meßgerät gebracht werden, in dem diese Messungen, der analytspezifischen energetischen Wechselwirkungen, durchgeführt werden.

Das Photometer kann z. B. Instabilitäten in der Anregungs-Lichtquelle zeigen. Die Intensität des reflektierten Lichtes hängt natürlich von der Intensität des eingestrahnten Lichtes ab, daher muß bei quantitativen Auswertungen auf dieses bezogen werden. Die auszuwertende Verfärbung oder Farbinintensität kann z. B. durch die Matrix der Probe ähnlich negativ beeinflusst werden, wodurch die Steigung einer Kalibrationsgeraden variiert wird und die Methode der Standardaddition ange-

wandt werden muß. Die Reflexionsphotometer zur Auswertung bestimmter Teststreifen arbeiten üblicherweise bei einer feststehenden Wellenlänge, um sie kompakt und damit tragbar zu machen.

Damit ist allerdings ihr Einsatzbereich nur auf diesen Spektralbereich begrenzt. Sie können die Vielfalt der bekannten Reagenzien nicht ausnutzen und sind für unterschiedliche Indikatoren nicht geeignet.

Aus Gründen erhöhter Selektivität können die trockenechemischen Teststreifen im allgemeinen neben dem eingeschränkt selektiven Reagenz noch weitere Zusatz- und/oder Hilfsstoffe (z. B. Puffer, Maskierungsreagenzien, Stabilisatoren, etc.) enthalten die Querstörungen durch andere Stoffe in der Probenmatrix ausschalten und die Anfärbung stabilisieren sollen. Allen gemeinsam ist aber, daß die Konzentrationsbestimmung (quantitative Analyse) über eine farbliche (wellenlängenmäßige) oder farbtintensitätsmäßige Bewertung erfolgt. Will man unterschiedliche Farben (z. B. bei Multi-Analyt-Messungen) vermessen, dann ist ein solches Gerät sehr kompliziert und muß einen Monochromator enthalten. Wegen dieses auch teuren Aufwandes gibt es kaum Meßgeräte, die die unterschiedlichen Farben der unterschiedlichsten Teststreifen objektiv vermessen können. Dies erschwert die genaue quantitative Vor-Ort-Analyse mittels Teststreifen oder -stäbchen erheblich.

Man hat es hier natürlich mit einem hundertprozentigen Relativ-Verfahren zu tun, das erfahrungsgemäß sehr matrixanfällig ist. Alles, was die auszuwertenden Farben beeinflusst, wie z. B. farbige Proben, Suspensionen, zusätzliche, absorbierende Schichten (z. B. Niederschläge, Eiweiß bei biologischen Proben, etc.), die bei der chargenweisen Kalibrierung des Herstellers nicht berücksichtigt wurden, führt zu Fehlmessungen.

Bei allen Schnell-Tests auf Basis der Trockenchemie geschieht der Probentransport nur über minimale Strecken, die durch Diffusion und/oder Kapillarkräfte überwunden werden. Es besteht hier keine Möglichkeit, frei wählbare analytisch-chemische Unit-Operations (Probennahme, Probenvorbereitung, extrahieren, ausfällen, ausgasen, filtrieren, oxidieren, reduzieren, neutralisieren, buffern, etc.), beliebig und anwendungsorientiert zu kombinieren.

Der Erfindung lag demnach folgende Aufgabe zugrunde: Die Unsicherheiten und Ungenauigkeiten der auf der Trockenchemie basierenden Teststreifen sollten beseitigt werden, ohne dabei den Verbrauch an Reagenzien oder die Einfachheit des Verfahrens entscheidend ändern zu müssen. Ferner sollten beliebige Unit-Operations systemmäßig einfach kombinierbar sein. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß die Einfachheit einer chemischen Analyse mittels eines Teststreifens, -stäbchens oder -röhrchens mit der Genauigkeit der Maßanalyse kombiniert wird. Dies führt zu einem kalibrationsfreien und hochgenauen Verfahren, zu einer sog. Absolutbestimmungsmethode ohne daß der Chemikalien-Abfall, verglichen zur Trockenchemie, wesentlich ansteigt.

Dazu wird erfindungsgemäß zunächst die Probennahme-Genauigkeit entscheidend dadurch verbessert, daß in einem separaten Probennahme-Modul eine oder mehrere Mikro- oder Mikro-Kapillar-Pipetten mit hochgenauem Volumen, die inzwischen preiswert herstellbar sind, verwendet werden. Desweiteren wird der Analyt in diesen genau bekannten Proben-Aliquoten mit oder ohne zusätzliche selektivitätserhöhenden Schritte in weiteren Funktions-Modulen maßanalytisch quantifiziert, wobei keine Farbtintensitäten genau fest-

gestellt werden müssen, sondern nur ein klar ausgeprägter Farbumschlag eines geeignet gewählten Indikators. Dies wird erfindungsgemäß mittels des Titrations-Moduls in einem oder mehreren Mikro-Reaktionsräumen oder Mikro-Reaktoren mit Hilfe eines dort vorgelegten, maßanalytischen Standardreagenzes (Maßlösung oder Titrator) unterschiedlicher Konzentration (Mikro-Reaktor-Titer) quasi simultan durchgeführt. Dazu wird das betreffende Titrationsmittel (Standardreagenz, Maßlösung) in genau abgemessenen, stöchiometrischen Mikro- oder Nano-Äquivalenten in geeignet geformte isolierte Mikro-Containments oder Mikro-Reaktoren oder in miteinander verbundenen Mikro-Reaktionsräumen zusammen mit einem geeigneten optischen Äquivalenzpunkt-Indikator immobilisiert. Wenn jeder dieser Mikroreaktoren (als Titrationsvolumen) mit der gasförmigen oder flüssigen Probe beispielsweise über eine Mikro-Kapillar-Pipette im darüber befindlichen Probenahme-Modul in Verbindung steht, genügt ein kurzes, zeitlich unkritisches Eintauchen in die flüssige oder gasförmige Probe, damit ein genau definiertes und bekanntes Proben-Aliquot durch Kapillarkräfte und/oder Diffusion und/oder der Schwerkraft in den Mikroreaktor gelangt, wo er mit einer genau bekannten Menge des Titrators reagiert.

Erfindungsgemäß ist es äußerst wichtig, daß die Probennahme-Pipetten im Probennahme-Modul auf der Seite der Mikro-Titrationsräume während der Probennahme (Kontakt mit der Probe) verschlossen sind, weil nur so eine hochgenaue Dosierung möglich ist. Dies wird erfindungsgemäß im einfachsten Fall durch sich selbst auflösende Membranen bewerkstelligt aber auch mikromechanische Ventile oder Lösungen mittels Schutzmembranen für die maßanalytischen Reagenzien, die mittels Dorn gezielt geöffnet werden können, sind möglich (s. Abb. 1).

Ein besonderer Vorteil des erfindungsgemäßen Mikrosystems ist, daß durch Kombination bestimmter, aufeinander konstruktionsmäßig hochgenau abgestimmter Module beliebig komplexe Schnell-Test-Anordnungen zusammengestellt werden können. Als Module kommen u. a. in Betracht: Probennahme-Modul mit einer oder mehreren Mikropipetten gleichen oder variierbaren Inhalts, Probenvorbereitungs-Modul in denen selektivitäts- und empfindlichkeitssteigernde Maßnahmen (u. a. auch Amplifikationen mittels der PCR-Methode) durchgeführt werden können, Bio-Reaktor Module, Oxidations-Module, Reduktions-Module, allgemeine Module zur Durchführung von chemischen Reaktionen, Trenn-Module mit Filtern oder gasdurchlässigen Membranen, Titrations-Module der unterschiedlichsten Versionen (kontinuierlich oder diskontinuierlich), usw. Diese Module passen konstruktionsmäßig genau übereinander und sind beliebig kombinierbar, wobei erfindungsgemäß eingeplante Verschiebungen untereinander Kanäle öffnen und schließen lassen (s. Abb. 2). Dabei können die einzelnen Module in direktem Kontakt (planare Oberflächen) stehen; es können aber auch dünne Spacer (z. B. aus Teflon o. ä.) als Dichtung dazwischen gelegt werden, wodurch bei entsprechenden Aussparungen auch weitere Verbindungskanäle zwischen den Modulen ermöglicht werden.

Die einzelnen Funktions-Module des erfindungsgemäßen mikrochemischen Analysen-Systems lassen sich geeignet zusammenfügen, aber auch getrennt verwenden. Module, in denen kein chemischer Umsatz mit dort immobilisierten aber inzwischen verbrauchten Reagenzien stattfindet, können nach Durchspülen von wenigen

mL Reinigungsmittel (meist Wasser) auch wiederverwendet werden. Wegen der großen Variationsbreite der zusammenstellbaren maßanalytischen Analysenverfahren können die einzelnen Module in großen Stückzahlen preiswert produziert werden.

Falls dazu als Probenahme-Modul ein Array von Mikro-Reaktoren mittels einer einheitlichen, selektiven maßanalytischen Reaktion aber mit unterschiedlichen Mengen des Titrators (Reagenz, das mit dem Analyten selektiv reagiert) versehen, verwendet wird, sind bei Verwendung der üblichen Äquivalenzpunkts-Indikatoren (s. V. Schmidt, W.D. Mayer, Analytiker-Taschenbuch Band 2, S. 207, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1981 und Band 3, S. 37, 1983) alle Mikro-Reaktoren im sog. Titrations-Modul, bei denen der Analyt in einem stöchiometrischen Unterschub vorhanden ist, anders gefärbt, als jene, bei denen der Titrator stöchiometrisch im Unterschub vorliegt. Da durch Verwendung von Kapillar- oder Mikropipetten die Probenmenge bekannt ist, ebenso die unterschiedlichen Äquivalenzmengen des Titrators in den einzelnen Mikro-Reaktoren oder Kanalstrecke, liegt die Analytkonzentration konzentrationsmäßig genau zwischen den Mikroreaktoren zwischen denen der Indikator umschlägt. Durch die moderne Technologie der photolithographischen Verfahren der Mikrosystemtechnik sind sowohl genaueste Mikropipetten wie auch Mikroreaktoren mit genau kontrolliertem Volumen einfach und preiswert herstellbar.

Da es sich hier wegen der Verwendung stabiler maßanalytischer Reagenzien um eine Absolutmethode handelt, kann bei konstanter und bekannter Proben-Aliquotisierung jedem Mikroreaktor oder jedem Streckenpunkt eines Mikroreaktions-Kanals ein Analytkonzentrationswert in beliebigen Einheiten (Mol/L, g/L, %, ppm, mg/dl etc.) zugeordnet werden. Erfindungsgemäß werden die Mikroreaktoren in einer geeigneten logisch durchschaubaren Anordnung mittels der modernen Methoden der Mikrosystemtechnik unter Einhaltung einer hoher Abmessungsgenauigkeit hergestellt.

Geeignete Herstellungsverfahren für die Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens sind vor allem alle photolithographischen Produktionsverfahren, bei denen die Größe der Mikro-Pipette und/oder des Mikro-Reaktors genau vorgegeben werden kann, bzw. auch graduell unterschiedliche Abmessungen im Promille-Bereich leicht herstellbar sind. Hierzu zählt erfindungsgemäß die bekannte Silizium-Technik, die durch die verschiedensten, dem Fachmann bekannten Prozesse, Mikro-Reaktoren beliebiger, aber genau kontrollierter Volumina auch in großen Massen mit den geringsten Streuungen herstellen kann. Das gleiche gilt für die LIGA-Technik, die nicht auf Silizium beschränkt ist, sondern auch preiswerte Spritzgußlösungen in Kunststoff ermöglicht. Bei Dosiergenauigkeiten im Prozent-Bereich kann dazu auch die sog. Dickfilmtechnik, die auf einer Siebdruckbasis aufbaut, verwendet werden.

Erfindungsgemäß läßt sich der Meßbereich einer solchen Test- und Analysenvorrichtung dadurch festlegen, daß im Titrations-Modul entweder eine Reihe graduell unterschiedlich großer Mikro-Reaktoren mit genau bekanntem Volumen hergestellt werden, die dann herstellermäßig mit einer einheitlichen Konzentration des Titrators gefüllt werden oder Mikro-Reaktoren einheitlicher und bekannter Größe (Füll-Volumen) werden mit unterschiedlich konzentrierten aber bekannten Titrator-Füllungen versehen (was herstellungsmäßig aufwendiger ist) oder Kombinationen von beiden.

Da die erfindungsgemäßen Technologien der Mikro-

systemtechnik Mikro-Reaktoren einheitlicher Form aber unterschiedlichem Inhalts in einem Arbeitsschritt herstellen können, sind diese Herstellungsmethoden (Silicium- und LIGA-Technologie) besonders vorteilhaft, weil dann der Füllprozeß mit dem Titrator mit einer einzigen, geeigneten Reagenzien-Mischung (Titrator, Hilfsreagenzien, Indikator(en) und Stabilisatoren) erfolgen kann. Bei der erfindungsgemäßen Version, die auf dem Ausmessen einer Strecke in einem Mikroreaktions-Kanal beruht, können natürlich die Abmessungen des Kanals in Laufrichtung auch variiert werden, was zu besonders großen Erfassungsbereichen führt.

Wird konstruktionsmäßig dafür Sorge getragen, daß das Proben-Aliquot im Mikroreaktions-Kanal in zwei Vorzugsrichtungen diffundieren kann (kontinuierliches Titrations-Modul), so ergeben sich besonders vorteilhafte Lösungen für eine Multi-Analyt-Anordnung. In diesem Fall können mehrere unterschiedliche maßanalytische Lineartitrations-Vorlagen für unterschiedliche Analyte beispielsweise in einer Reihe teststreifenähnlich untergebracht werden. Die gemeinsame Probe dringt nach dem Ausführungsbeispiel der Abb. 3 nach der parallelen Probenahme mittels einer schlitzförmigen Kapillare (7) in die darunter befindliche Präzisions-Kanalzone (8), wo die unterschiedlichen Analyt-Abfang- und Indizierungsreagenzien mit einem genau kontrollierten und bekannten Strecken-Titer vorliegen. Hier diffundiert das Proben-Aliquot in beiden Kanal-Längs-Richtungen, wobei der Analyt durch das dort immobilisierte Maßreagenz titriert wird. Je nach der vorliegenden Analyt-Konzentration ergeben sich dadurch mehr oder weniger breite Zonen, die durch einen Indikator unterschiedlich zum anderen Streckenabschnitt angezeigt werden. Bei erfindungsgemäßen Multi-Test-Streifen nach dieser Methode müssen zur quantitativen Auswertung nur noch die unterschiedlich breiten Anfärbezonen der unterschiedlichen Analyte streckenmäßig vermessen werden, was beispielsweise mit Barcode-Lesern geschehen kann. Letzterer kann auch die Analyt-Kodierung (9) auslesen.

Erfindungsgemäß ist aber auch ein umgekehrtes Vorgehen möglich, d. h. der Titer einer Mikro-Reaktionskammer (Mikro-Reaktoren gefüllt mit konstant gehaltenen Mikro-Äquivalenten) im Titrations-Modul wird konstant gehalten und die Größe der getesteten Probe wird im Probenahme-Modul entsprechend graduell in bekannten Volumenschritten variiert, was dem maßanalytischen Äquivalent einer Titration einer bekannten Menge "vorgelegter" Standardlösung mit der Probelösung entspricht. Am Endpunkt, d. h. beim Umschlagpunkt des geeignet gewählten Indikators liegen chemisch äquivalente Mengen von Analyt und maßanalytisches Reagenz vor, die eine Absolutbestimmung erlauben.

Der große und entscheidende Vorteil der neuen erfindungsgemäßen Klasse von Analysentechniken liegt darin, daß Meßsignal-Beeinflussungen durch Intensitätsbeeinflussungen anderer Art (matrixbedingte Signalbeeinflussungen etc.), die üblicherweise die Konzentrationsinformation: Signalintensität verfälschen, hier unerheblich sind. Üblicherweise erfolgt der deutlich sichtbare Umschlag des jeweils verwendeten Indikators genau zwischen zwei Mikroreaktoren, deren Äquivalenzkonzentration genauestens bekannt ist. Der Gehalt der Probe an Analyten muß also genau dazwischen liegen, was man durch eine entsprechende, unveränderlich dort angebrachte Skalierung (Mittelwert von beiden) auch vereinfachen kann.

Vorteilhaft ist auch, die Mikro-Reaktoren im Titrations-Modul in einer Reihe zu- oder abnehmender Füllvolumina bzw. Mikro-Äquivalente anzuordnen, weil dann bei einem gleichbleibenden Abstand zwischen zwei benachbarten Mikro-Reaktoren die Auswertung übersichtlicher wird und auf das Ablesen einer Strecke oder einer daneben aufgedruckten Skala hinausläuft.

Erfindungsgemäß ist es unerheblich, ob die einzelnen Mikro-Reaktoren sich berühren oder nicht; eine kontinuierliche Volumenvergrößerung von grabenartigen Hohlräumen genauester Abmessungen gestattet so u. U. genauere Ablesungen. Die geometrische Form dieser Mikro-Gräben ist dabei unerheblich. So kann man bei einer linearen Form beispielsweise thermometerähnliche Vorrichtungen erhalten; bei einer kreisförmigen Anordnung eher uhr-ähnliche. Die Grabendimensionen liegen eher im Mikrometer- denn im Millimeterbereich. Die Abb. 6 verdeutlicht eine bevorzugte Ausführungsform in Papiertechnologie. Der obere Teil zeigt in Papier gelegte Diffusions-Reaktions-Kanäle unterschiedlicher Breite aber mit konstantem Flächen-Titer des maßanalytischen Reagenzes.

Erfindungsgemäß liegt ein echtes modulares Mikrosystem vor, das entsprechend miniaturisiert ist und auch in die Bereiche der Ultra-Mikro-Analyse eindringen kann. Bei chemischen Umsetzungen im Mikroliter und Nanogramm Maßstab werden, verglichen mit der gängigen Laborpraxis, Chemikalien um den Faktor ca. 1 Million eingespart, entsprechend gering ist auch die Abfallbelastung. Wegen des Fortfalls gründlicher Gefäßreinigungsschritte werden auch weniger Spülmittel pro Analyse verbraucht.

Bei einer extremen Miniaturisierung des Mikrosystems erreicht man eine Grenze der Ablesbarkeit mit dem bloßen Auge. Hier wird erfindungsgemäß ein einfaches Auswertgerät benutzt, daß den Titrations-Modul stark vergrößert darstellen kann. Eine vorteilhafte Anordnung entsteht dadurch, daß man eine stark vergrößerte Projektion, ähnlich einem Hand-Dia-Betrachter, durchführt. Da es nur auf die Stelle und/oder Position des Indikator-Umschlages ankommt, können dazu auch einfache, mit Tageslicht arbeitende Vorrichtungen verwendet werden.

Es können sämtliche bekannten Testvorrichtungen der Trockenchemie auch in der erfindungsgemäßen Version einer Art absolut messenden, linearen Titration(vorrichtung) umgewandelt werden. Dazu muß nur der Analyt durch steigende und äquivalente Mengen eines Reagenzes gebunden oder aus dem Lösungsgleichgewicht entfernt werden, was die Farbreaktion mit dem jeweiligen Anfärbe-Cocktail verhindert. So lassen sich beispielsweise Metallkationen bei einem geeigneten pH-Wert (immobilisierter Puffer) durch das bekannte Reagenz Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) so stark komplexieren, daß der betreffende selektive Anfärbe-Cocktail der Trockenchemie keine Anzeige erbringt. Erst nach Überschreiten einer der Analytkonzentration in der Probe entsprechenden Mikro-Äquivalenz-Menge liegt das Metallkation wieder frei im Lösungsgleichgewicht vor und ab diesem Mikroreaktor sind alle weiteren mit geringeren Äquivalenzmengen an Komplex-Standardmittel in Sinne der Trockenchemie unterschiedlich stark angefärbt. Letzteres läßt sich gegebenenfalls bei einer reflexionsphotometrischen Auswertung auch zu einer Extrapolationsmethode zur genauen Endpunktsermittlung ausnutzen.

Die Übertragung der vorliegenden Erfindung des kontrollierten Immobilisierens maßanalytischer Rea-

genzien auf die klassische Trockenchemie der Teststreifen erlaubt dort eine neue Art von Auswertung durchzuführen. Durch die Immobilisierung von Analyt-Abfang-Reagenzien lassen sich Analysen gemäß der bekannten Methode der Standard-Subtraktion durchführen; während die Immobilisierung des Analyten selbst zu der Methode der Standard-Addition führt. Beide Auswertmethoden haben sich in der instrumentellen Analytik im Spurenbereich und beim Vorliegen komplexer Matrices bestens bewährt, weil sie die Möglichkeit systematischer Fehler stark einengen.

Es lassen sich bestimmte Anionen dadurch quantitativ erfassen, daß in den Mikro-Reaktoren unterschiedliche, aber genau bekannte Metallkationen-Mengen, die mit dem Anion einen schwerlöslichen Niederschlag bilden, mit dem zugehörigen Anfärbereagenzien eingebracht werden.

Die neuen, verschiedenen, erfindungsgemäßen Analysetechniken kann man als pseudo-eindimensional bezeichnen, da die immobilisierten Moleküle des selektiven Analytabfängers und des Analyt-Anzeigers zwar einen dreidimensionalen Raum einnehmen, aber nur die Ausdehnung einer Dimension (= markierte Strecke) oder die Lokalisation der der Analytkonzentration entsprechenden Äquivalenzmenge an Titrator meßtechnisch ausgewertet wird, was beispielsweise über eine dort angebrachte Skala analog der Ablesung einer Quecksilbersäule in einem Thermometer oder Barometer oder einer Uhr bei kreisförmiger Anordnung geschehen kann.

Einen besonders großen dynamischen Meßbereich erhält man, wenn man die mögliche Genauigkeit der Maßanalyse voll ausnutzt und um die 1000 Mikro-Reaktoren mit den dazugehörigen Mikro-Pipetten in einer zweidimensionierten, planaren Anordnung (z. B. in 30 Reihen und 30 Spalten im Scheckkartenformat) unterbringt. Hier kann die maßanalytische Reagenzpositionierung und damit Graduierung auch so verlaufen, daß beispielsweise waagerecht größere Konzentrations-sprünge zwischen den einzelnen Mikroreaktoren vorliegen und die in vertikaler Anordnung befindlichen diese größeren Sprünge in kleineren Sprüngen unterteilen. Dies ist natürlich auch in beliebigen anderen geometrischen Formgebungen möglich, so z. B. auch radial, sternförmig. Die Mikrosystemtechnologie erlaubt beispielsweise hier auch dreidimensionale Gebilde z. B. Würfel mit jeweils zweidimensionaler Anordnung der betreffenden Mikro-Reaktoren-Arrays. Hierdurch lassen sich durch die 6 Seiten eines Würfels im Prinzip auch leicht 6 Konzentrationsdekaden eines Analyten überstreichen. Herstellungsseitig wird man bei gleichbleibender Volumengraduierung der Mikro-Reaktoren pro Würfelseite hier vorteilhafterweise pro Seite die Konzentration der maßanalytischen Füll-Lösung entsprechend dem gewünschten dynamischen Meßbereich verändern. Bei Anwendungen dieser neuen Mikrotitrationsmethode in Fällen, wo der zu erwartende Konzentrationsbereich des Analyten nur in bestimmten Grenzen variiert, wie beispielsweise in der klinischen Analytik, kann man natürlich die Anzahl der Mikro-Reaktoren entsprechend der gewünschten Ablesegenauigkeit wählen und so z. B. mit weit weniger als 100 Mikroreaktoren, die bezüglich der dort immobilisierten Mikro-Äquivalente dem erwarteten Bereich entsprechen, auskommen. Dies entspricht einer Lokalisationsgenauigkeit im festgelegten Bereich von 1%.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung erlaubt, wie oben gezeigt, auch die quantitative Bestimmung mehrerer

Analyte. Bei Multi-Analyt-Anordnungen bestimmen die bekannten analyterkennenden Reagenzien oder -gemische (s. Trockenchemie) die Selektivität und ihre Anordnung auf oder in dem Träger eine Reihenfolge der Streifenposition auf dem Träger, die aussagt, um welchen Analyten es sich handelt und die jeweilige gefärbte oder ungefärbte Strecke oder die Position (digital) sagt aus, welche Konzentration des betreffenden Stoffes aktuell in der Probe vorliegt. Auch hier sind erfindungsgemäß lineare, planare und dreidimensionale Anordnungen von Mikro-Reaktor-Arrays möglich.

Eine derartige Anordnung kann bei einer Markierung, die durch elektromagnetische Strahlung erfassbar ist, vorteilhaft, schnell und sicher auch mittels eines geeigneten sog. Barcode-Lesers, der ja nur die unterschiedlich gefärbten Bereiche erfassen muß, automatisch in absoluten Konzentrationseinheiten vermessen werden. Hier zählt der Barcode-Leser eigentlich nur die Anzahl der Mikro-Reaktoren bis zum Äquivalenzpunkt-Reaktor ab, was auf eine absolute, digitale (Anfärbung oder Farbumschlag: ja oder nein) Analyse hinausläuft.

Dadurch, daß die absoluten Farbintensitäten der Indikatoren keine Rolle spielen, ist es auch egal, ob evtl. ein Mikroreaktor im Bereich vor oder nach dem Äquivalenzpunkt gestört ist oder nicht. Diese Bereiche der Mikro-Reaktoren stellen redundante Systeme dar. Dies erhöht die Meßsicherheit ebenfalls wesentlich, verglichen zu den traditionellen Teststreifen. Sogar gegenüber einer klassischen maßanalytischen Titration ergeben sich entscheidende Vorteile: Man kann nicht übertitrieren und man hat automatisch eine Endpunktsdokumentation. Ablese- und Übertragungsfehler können ebenfalls weniger auftreten und die Titration ist schneller und mit bedeutend weniger Reagenzien durchgeführt. Wenn erfindungsgemäß die neue Vorrichtung zur Durchführung derartiger Titrationen preiswerter herstellbar ist als die Reagenzien für die Makro-Titration einschließlich ihrer Entsorgung kosten, dann wird die Mikrotitration die klassische verdrängen.

Erfindungsgemäß beinhaltet die vorliegende Umwandlung von konzentrationsabhängigen Meßsignal-Intensitätsmessungen in eine eindimensionale, skalierte Streckenmessung auch integrierte Trennoperationen. Für richtige quantitative Analysen komplexer Stoffgemische (z. B. realer Proben aus dem Umwelt-, Medizin-, Biochemie, Materialwissenschafts-, Produktionskontroll-Bereich) werden in der Regel mehr oder weniger aufwendige Analysenverfahren verwendet. Viele beruhen auf einer Kombination von komplizierten Trenn- und Bestimmungsmethoden.

Die hier beschriebene Erfindung löst generell all die dem Fachmann geläufigen Probleme, in dem prinzipiell die jeweiligen Analytkonzentrationen nicht über störanfällige Meß-Signal-Intensitäten sondern mit Hilfe einer vorzugsweise eindimensionalen geometrischen Ausdehnung oder Positionsbestimmung einer optisch erkennbaren Markierung auf einem Träger gemessen werden (Dimension des Meßwertes: eine Längeneinheit (oder skalierte Position) oder bei konstanter Relativbewegung zu einem Signal-Ausleser: eine Signaldauer = Zeiteinheit). Die optisch erkennbare Zone wird, wenn der Analyt keine spezifische, direkte, optische Wechselwirkung erlaubt, durch Reaktion des Analyten mit einem geeigneten, analytspezifischen Nachweis-Reagenz (Indikator) auf einem Träger erzeugt, wobei der Träger dieses Reagenz immobilisiert enthält.

Die Analyse wird im Gegensatz zu den bekannten Teströhrchen für die Gasanalyse, vorzugsweise auf pla-

nar aufgebauten Trägern durchgeführt, die wie eine Scheckkarte oder ein Papier-Teststreifen aufgebaut sind und einen schichtenförmigen Aufbau, vorzugsweise eine laminaförmige Struktur haben; jedoch sind auch andere geometrische Formen (z. B. schalen- oder röhrenförmig, oder kreis-, spiral- oder kugel- bzw. würfelförmig) möglich. Ebenso ist es erfindungsgemäß unerheblich, ob auch andere geometrische Formen (wie Kreise, Punkte, Keile etc.) für die optische Abfrage (Meßsignal = Ausdehnung) benutzt werden. Gegenüber den bekannten Gas-Prüfröhrchen, die meistens auf einer durchsichtigen gefüllten Säule beruhen, die mit einem Trägermaterial gefüllt sind und auf dessen Oberflächen sich ein analytselektives Reagenz befindet, besitzt die erfindungsgemäße Vorrichtung lage- und positionsabhängig, extrem exakt dosierte Titratoren und/oder Analyt-Abfangreagenzien und eine integrierte Proben-Aliquotisierung durch die Mikro-Pipette, die erfindungsgemäß mit der Silizium- oder LIGA-Technologie zusammen und in einem einzigen Arbeitsschritt hergestellt werden. Die Dosierung und Positionierung des maßanalytischen Reagenzes ist bei der traditionellen Gasprüfröhrchen-Art (K. Lechnitz, Analytiker-Handbuch, Band 1, S.205, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1980) nicht mit der Genauigkeit möglich, die die Mikrosystemtechnik inzwischen bietet. Auch werden hier nicht immer stabile maßanalytische Reagenzien verwendet.

Die progressiv ansteigenden Ketten von Mikro-Reaktionsräumen lassen sich in den verschiedensten Technologien anfertigen. Bei einer Ausführungsvariante aus Papier beginnt der laminaförmige Aufbau beispielsweise mit einem empfindlichen und spezifischen Indikator, der bei Anfärbung generell die Anwesenheit des betreffenden Analyten anzeigt. Auf diesem Indikator-Papierstreifen werden in bestimmten Abständen steigende Mengen eines Abfangreagenzes, welches in der Makro-Labor-Titrationsversion dem Titrator (Titrationsmittel mit bekanntem Titer) entspricht, immobilisiert. Dies kann wiederum auf die unterschiedlichste Art und Weise geschehen. So kann man beispielsweise die Konzentrationen des selektiven Abfangreagenzes in einem trocknungsfähigen Gel sukzessive, von Mikro-Reaktionsraum zu Mikroreaktionsraum, erhöhen und die Begrenzungen dieser Räume durch eine der Siebdrucktechnik entlehnten Weise festlegen. Man kann bei dieser sog. Dickfilmtchnik aber auch steigende Mengen der zu immobilisierenden Komponente durch einen mehrfachen Druckvorgang aufbringen. Als Abschluß wird eine durchsichtige Lage eines auch abdichtenden Stoffes über die Reihe der Mikro-Titrations-Räume gelegt. Dies kann beispielsweise auch durch einen kompletten Einschluß des so vorbereiteten Teststreifens in eine wärmepolymerisierbare Folie (Prinzip der ID-Karten oder Ausweise) geschehen.

Eine weitere Variante dieser seriellen Mikro-Titrationsart besteht erfindungsgemäß nur aus einer gleichbleibenden Immobilisierungsdichte des analyt-spezifischen Reagenzes (Titrator) über die gesamte ausgedehnte Analyt-Indikator-Zone. Bei einer kontrollierten Schichtdicke und einem diffusionskontrollierten Eindringen des Analyten durch gegebene Öffnungen in der äußeren Abdeckfolie bewegt sich die Probenlösung aufgrund von Kapillarkräften in dieser Schicht des immobilisierten Anfangreagenzes und wird dabei sukzessive titriert (genauer: rücktitriert, da zunächst der Überschuß des Titrators durch die eindiffundierende Analytmenge beseitigt werden muß), wobei dann die Strecke

des Analyt-Überschusses wegen des Indikators eine Anfärbung zeigt.

Eine andere Technologie kann beispielsweise auf der LIGA oder Silizium-Technologie beruhen. Mittels beider Technologien lassen sich Mikro-Reaktionsräume mit höchster geometrischer Genauigkeit und Reproduzierbarkeit in beliebigen Anordnungen herstellen. Bei der Vorgabe exakter Reaktionsvolumina kann man beispielsweise als Alternative zu variierenden Immobilisierungsdichten die Abmessungen der Mikro-Reaktoren progressiv vergrößern, was bei einer gleichbleibenden Füllhöhe mit dem analyt-spezifischen Abfangreagenz (Titrator) zu steigenden dort immobilisierten Mengen führt. Die eigentliche Form dieser Mikro-Reaktoren ist unwichtig, solange das Eindiffundieren der Probe nicht zu stark beeinflusst wird. So können es beispielsweise rechteckige, runde oder kugelförmige Vertiefungen (Mikro-Kavities) in Kunststoffen (z. B. Plexiglas, PET, PE etc.) sein, die besonders vorteilhaft mit der LIGA-Technik (H. Lehr, W. Ehrfeld, J. Phys. IV (1994), 4 (C91229)) produziert werden; es können aber auch sog. Containments sein, die üblicherweise als Hohlräume in Silizium geätzt worden sind. Vorteilhafte Ausführungsformen sind natürlich in linearer Anordnung dieser progressiv reagierender Mikro-Reaktoren aufgebaut, was die Ablesung analog einem LED-Array sehr erleichtert.

Wenn erfindungsgemäß die Ermittlung von Stoffkonzentrationen nicht über die Intensitäten sondern über eine Streckenmessung erfolgt, dann ist, wie oben bereits erwähnt, die Farbe und die intensitätsmäßige Konstanz dieser spezifisch angefärbten Zone unerheblich; die Farbintensität bestimmt eigentlich nur die Empfindlichkeit, mit der Anfang und Ende der Meßstrecke erkannt werden können. Schwankungen in der Beleuchtung (Lichtquelle), die zur Abmessung der optisch markierten Strecke verwendet wird, sind im Gegensatz zu den bekannten optischen Auswertemethoden hier ohne größeren Einfluß auf das Ergebnis der Messung (Meßwert = Strecke).

Die Erfindung betrifft also ganz allgemein insbesondere die Umsetzung einer analytkonzentrationsabhängigen Lichtintensitäts-Messung (Photometrie: Absorption oder Reflexion; Fluorimetrie) in die einer Ausdehnungsmessung. Barcode-ähnliche Anordnungen erlauben dann einfache und schnelle Simultan-Messungen der unterschiedlichsten Analyte, wobei alle bekannten optischen Anzeigeverfahren der betreffenden Chemo- und Biosensoren vom Fachmann erfindungsgemäß umgesetzt werden können. Die Position des optisch markierten Streifens bestimmt die Stoffart (qualitative Analyse) und die angefärbte oder nicht angefärbte Strecke ist konzentrationsproportional (quantitative Analyse). Erfindungsgemäß ist die Ablesung der maßanalytischen Äquivalenz-Konzentration nicht nur auf den sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums begrenzt. Erfindungsgemäß können auch weitere Äquivalenz-(Endpunkt) Bestimmungsmethoden verwendet werden. So läßt sich beispielsweise dies elektrochemisch mittels eines einzeladressierbaren Elektroden-Arrays, das mit einer planaren Mikro-Reaktor-Anordnung in Berührung gebracht wird, durchführen.

Die vorliegende Erfindung kann mit oder ohne eine integrierte Trennungsoption umgesetzt werden. Vorbild für eine Ausführungsvariante der Erfindung mit Trennung sind alle Arten der Dünnschicht-, Papier-, Gel-, Affinitäts-Chromatographie sowie die verschiedensten trägergebundenen elektrophoretischen Verfah-

ren. Dort weiß der Fachmann, daß u. U. auch die Ausdehnung eines Substanzflecks als ungefähres Maß für die vorliegende Menge (Konzentration) herangezogen werden kann. Um diese Chromatographie-Arten allerdings durch einen einfachen Barcode-Leser (Ja oder Nein Entscheidung; nicht gefärbt — gefärbt) ablesbar zu gestalten muß die Diffusion des oder der Analyten in Richtung quer zur Strömungsrichtung der mobilen Phase verhindert werden. Dies geschieht erfindungsgemäß mittels effektiver Diffusionssperren. Geeignet dazu sind alle Materialien, in denen der Diffusionskoeffizient gegenüber dem in Flüssigkeiten vernachlässigbar ist. Dies ist im allgemeinen bei Festkörpern der Fall. Erfindungsgemäß läuft daher eine Chromatographie, die mit Barcode-Lesern auswertbar ist, in fest vorgegebenen, zweidimensionalen Betten (oder Kanälen) konstanter Vertiefung, in denen sich die stationäre Phase befindet, ab.

Bei multiplen Kanälen für die Mehrfachanalyse, die parallel angeordnet sind, müssen sich die seitlichen Begrenzungen gut oberhalb der Oberfläche der stationären Phase befinden, damit kein "Überkriechen" der mobilen Phase in benachbarte Trennstrecken stattfindet. Die geometrische Form der chromatographischen Kanäle ist weniger bedeutsam. Bewährt haben sich halbkreisförmige, ovale, V-förmige, trapez- und rechteckförmige Vertiefungen (Kanäle) gleichbleibender Tiefe auf den unterschiedlichsten Trägermaterialien (z. B. Glas, Keramik, Silizium, Kunststoff, Metall, etc.), die mit den gängigen und bekannten chromatographischen stationären Phasen (fast) dünn-schicht-chromatographie-artig gefüllt sind. Je kleiner die Kanäle sind, umso mehr können auf einem Träger mit gegebenen Abmessungen untergebracht werden. Daher sind Mikrokanäle mit Abmessungen im Mikrometerbereich sinnvoll. Nach einer bestimmten, matrixabhängigen Auftrennstrecke, die mittels bekannter, der Trennung förderlicher Materialien gefüllt ist, folgt erfindungsgemäß der Übergang zu einem Mikro-Kanal oder -graben, dessen geometrische Abmessungen im Sinne der Erfindung reproduzierbar und bekannt variieren, so daß dort unterschiedliche Mengen eines Analyt-Titrators oder -Abfängers zusammen mit dem Anzeige-Cocktail (Indikator) immobilisiert werden können. Bei längeren Trennstrecken kann die durch die Kapillar-Mikro-Pipette gezogene Probenmenge nicht ausreichen, nach der Trennzone die Bestimmungszone zu erreichen. In diesem Fall wird die Testvorrichtung nach dem Abstreifen einer Benetzungsschicht in eine Lösung getaucht, die dann die chromatographische mobile Phase darstellt. Letztere wird vorzugsweise durch reine Kapillarkräfte zur Bestimmungszone transportiert. Dort wird der von den anderen Bestandteilen getrennte Analyt wie zuvor beschrieben zweidimensional titriert (Quantifizierungszone für die Absolutbestimmung). Da der Analyt hierbei den mit dem Titrator gefüllten Mikro-Kanal waagrecht durchströmt, kann bei ähnlichen Analyt-Konzentrationen auch mit einem gleichbleibenden Querschnittsvolumen gearbeitet werden. Erst wenn der Analyt auf seinem Weg vollständig mit dem dort fixierten Titrator reagiert hat, ist er mit dem selektiven Anfärb-Cocktail nicht mehr anfärbbar. Folglich kann auch die Dünnschicht-Chromatographie erfindungsgemäß in eine einfach abzumessende Absolut-Methode umgewandelt werden.

Pro Chromatographie-Kanal kann eine Analyse durchgeführt werden und wegen der standardisierten Herstellungsbedingungen der Mikrosystemtechnik können auch mehr Kanäle für Multi-Analyt-Messungen mittels geeigneter Trenn- und Bestimmungszonen leicht

und preiswert in Massen produziert werden. Dies führt erfindungsgemäß zu einem neuartigen, miniaturisierten Multi-Analysensystem, das die traditionelle Dünnschicht-Chromatographie bezüglich der Anzahl Analysen pro Fläche und bezüglich der Genauigkeit und Auswertungs-Einfachheit wesentlich erweitert.

Die Kanal-Länge ist durch die Abmessungen des Trägers bestimmt und liegt im Bereich weniger Zentimeter (vorzugsweise 1 bis 20 cm). Wenn der Träger dieser Trennstrecken Silizium ist, lassen sich mittels der bekannten Techniken der Mikro-Elektronik eine extrem hohe Anzahl an engen vorzugsweise parallelen Kanälen (durch Photolithographie und anisotrope Ätzung) sehr einfach und gleichmäßig erzeugen. Bei Kunststoff-Trägern kann die bekannte LIGA-Technik angewandt werden, die ähnliches ermöglicht. Quarz, Glas, Metall und andere Festkörper lassen sich aber ebenso durch bekannte Techniken entsprechend ritzen oder ätzen. Es sind aber auch kreisförmige Kanal-Anordnungen möglich. Theoretisch lassen sich so pro Zentimeter Trägerbreite weit über 10 Parallel-Analysen durchführen (vergl. Schallplattenrillendichte).

Erfindungsgemäß muß sich bei nicht-elektrophoretischen Trennungen die Korngröße der stationären Phase dem Kanalquerschnitt anpassen. Kanäle im Mikrometerbereich verlangen zur optimalen Funktion eine nanopore stationäre Phase. Die Kanäle können oben offen oder aber auch abgedeckt betrieben werden. Bei einer dichten Abdeckung füllt die stationäre Phase zeckmäßig den gesamten aus dem Kanal und der Abdeckung gebildeten Hohlraum aus. In einer weiteren Ausführungsform löst die mobile Phase die auf der Innenseite der Abdeckung befindlichen Substanzen zum Stoff-Nachweis auf und verteilt sie durch Diffusion über den gesamten Querschnitt.

Vorteilhaft ist, wenn sich der Bereich mit dem immobilisierten, analytanziehenden Reagenz und dem Titrator am Ende der Trennstrecke befindet, weil dann die Abtrennung von Störkomponenten gegeben ist. Wichtig ist erfindungsgemäß, daß sich die Zone mit dem aufgetrennten Analyten durch die Reaktion mit diesen Reagenzien vom Untergrund abhebt. Bei analyt-spezifischen Reagenzien kann auf eine vollständige Auftrennung verzichtet werden und man kann die Quantifizierungszone nach vorne schieben, was die Analysenzeit reduziert.

Die Auswertung geschieht mit bloßem Auge an Hand einer Skala, die herstellungsbedingt gegeben ist oder auch in einfachen barcode-ähnlichen Ableser-Automaten: Entweder wird eine angefärbte Zone die Grundreflexion im Analysenkanal konzentrations-abhängig verändern. Es können u. a. aber auch fluoreszierende Zonen (aktive Fluoreszenz) oder umgekehrt Zonen mit ausgelöschter Fluoreszenz (negative Fluoreszenz) vermessen werden.

Erfindungsgemäß können je nach der ungefähr bekannten Laufzeit und Laufstrecke eines Analyten dort lokal auch unterschiedliche Anfärb-Chemikalien für den oder die Analyten (auch biochemischer Art: enzymatisch oder immunologisch) bereitgehalten werden. Dies erhöht die Vielseitigkeit und Selektivität beträchtlich.

Das erfindungsgemäße Verfahren unterscheidet sich von der klassischen Chromatographie bzw. Elektrophorese bezüglich seiner Durchführung mittels eines Laufmittels bzw. Elektrolyse in einem geeigneten Elektrolyt-Puffer mit oder ohne "Entwicklung" oder "Fixierung" der Trennstrecke nicht. Die Durchführung der Trennung

gen wird allerdings erheblich durch den Fortfall der Entwicklung beschleunigt und vereinfacht. Die Reagenz-Zugabe erfolgt erfindungsgemäß wesentlich genauer dosiert, was Vorteile bei der Materialeinsparung und in umwelt-relevanter Hinsicht bringt. Die gesteigerte Kapillarwirkung bei engen Kanälen erhöht die Strömungsgeschwindigkeit des Laufmittels und verkürzt dadurch die Analysenzeit beträchtlich.

Durch standardisierte Herstellungsbedingungen lassen sich Trenn-Kanal-Träger herstellen, bei denen im Falle ebenfalls standardisierter Anwendungsbedingungen die zu bestimmenden Stoffe stets als mehr oder weniger ausgedehnte Zone an einer bestimmten Stelle vom Startpunkt entfernt auftreten. Ein Barcode-Leser, der für den bekannten optischen Effekt (Untergrundabhebung durch Anfärbereich) empfindlichkeitsmäßig optimiert ist, erhält nach einem Startsignal bei konstanter Streckenabtastgeschwindigkeit (Scan-Rate) ein weiteres Signal, dessen Zeitverzögerung für die Stoffart steht und dessen Zeitdauer (Streifenbreite) von der Konzentration des Analyten abhängt. Weitere Anfärb-Zonen entsprechen weiteren/anderen Stoffen, die mit oder ohne zusätzlich selektivitätserzeugende Reagenzien simultan vermessen werden können, wobei der zeitliche Beginn des Meßsignals für die zu bestimmende Substanz steht und die Dauer (Strecke, mit konstanter Geschwindigkeit abgescannt) für die Konzentration. Erfindungsgemäß kann diese Auswertung auch in speziellen Meßgeräten durchgeführt werden, die die Trennstrecken ähnlich schnell wie ein CD-Player an einem analogen optischen Reader vorbeibewegt. Auf diese Weise lassen sich vor allem Träger mit vielen Trenn-Kanälen sehr schnell vermessen. Bei circularen Trenn-Kanälen sind einem CD-Spieler sehr ähnliche Geräteaufbauten, die in wenigen Sekunden Tausende von Analysen auswerten, möglich. Kreisförmige Trenn-Kanäle erfordern allerdings insbesondere bei der Elektrophorese spezielle Start- und Endzonen mit Elektrolytkontakt zur Übertragung des elektrischen Feldes.

Zweckmäßigerweise optimiert man die parallel zu bestimmenden Stoffe nach dem betreffenden Anwendungsfall. In der klinischen Chemie werden beispielsweise die sog. Elektrolyte parallel bestimmt. Alternativ läßt sich beispielsweise Glucose mit Lactat, Kreatinin, Harnstoff und Harnsäure simultan bestimmen, wenn beispielsweise als Reagenz die betreffenden Oxidasen immobilisiert werden, die eine dem Analyten stöchiometrisch entsprechende Menge Wasserstoffperoxid mittels des Co-Substrates Sauerstoff erzeugen. Zur absoluten Konzentrationsbestimmung der Wasserstoffperoxid-Menge wird diese erfindungsgemäß in Anlehnung an eine Redox-Titration mit einem immobilisierten Reduktions- oder Oxidationsmittel "zweidimensional titriert".

Eine weitere Variante der Erfindung lehnt sich mehr einer Auswertung über sog. Barcode-Leser an und verzichtet ganz auf Trennoperationen. Hier wird erfindungsgemäß eine barcode-lesbare konzentrationsproportionale "Streifenbreite" durch eine vorgegebene geometrische Probenauftrags- oder -kontaktzone und ein progressiv durchgeführtes Abfangen des Analyten oder seiner konzentrationsproportionalen Reaktionsprodukte mit einem speziellen selektiven Reagenz erzeugt.

Für eine kalibrationsfreie, absolute Analyse muß allerdings das aktuell analysierte Aliquot der Probe konstant und bekannt sein. In diesem Fall ist dem jeweiligen Mikro-Reaktor eine Mikro-Probenahme-Vorrichtung vorgeschaltet. Dies kann erfindungsgemäß beispielsweise

se dadurch geschehen, daß beim Einbringen des Barco-de-Analyse-Teststreifens in die Probe eine präzise Mikropipette durch Kapillarkräfte gefüllt wird und dann durch unterschiedliche Mechanismen das Eindringen weiterer Probe verhindert wird. Dies kann durch die verschiedensten Mikroventile (Aktuatoren) erfolgen, die elektrisch, magnetisch oder andersartig bewegt werden können. Eine vorteilhafte, energiemäßig passive Form ist die einer Rückschlagklappe am Mikro-Pipetten-Eingang, die dadurch geschlossen wird, daß eine flüssige Probe eine zuvor dort stationierte aufquellende Substanz diese Klappe fest abschließt. Bei gasförmigen Proben, die in der Regel auch größere Pipetten-Räume benötigen, sind passive magnetische Ventile die mittels externer Magnetfelder von außen gesteuert werden können, eine vorteilhafte Lösung. Wichtig ist erfindungsgemäß nur, daß die jeweils aktuell untersuchte Probenmenge sehr genau bekannt ist und durch die Graduierung in Mol-Bruchteilen mittels der immobilisierten Titratoren kalibrationsfreie, absolute Konzentrations-Messungen möglich werden.

Zusammenfassend lassen sich folgende besonders vorteilhafte Varianten der Erfindung aufzählen:

- a) Das Proben-Aliquot im Mikroliterbereich ist genauestens bekannt und konstant für jeden Mikro-Reaktor, der sich in unmittelbarer Nachbarschaft zur Pipette befindet. Die Graduierung der Maßlösung erfolgt durch unterschiedlich große und genauestens bekannte Volumina dieser Reaktoren. Die Füllung geschieht herstellmäßig einfach mit einer einzigen Maßlösung, die mit allen Hilfsreagenzien (spezifischer, analytselektiver Indikator, Maskierungsmittel, Puffer, Stabilisierungsmittel, etc.) versetzt ist. Die Immobilisierungsart, ob als Gel, Suspension oder später eintrocknende Flüssigkeit, ist unwesentlich.
- b) Das Proben-Aliquot im Mikroliterbereich ist genauestens bekannt, variiert aber durch eine geeignet konstruierte Vorrichtung in einer fein abgestuften Menge von bis zu 1/1000stel. In diesem Fall ist die Graduierung der Maßlösung (einschließlich Hilfsreagenzien, wie Indikator, Puffer, etc.) in der einzelnen Mikroreaktoren gleich und ebenso genauestens bekannt. Diese Variante entspricht einem umgekehrten Vorgehen wie unter a) beschrieben.
- c) Kombinationen aus a) und b) wobei bei gegenläufigen Graduierungen besonders große, erfaßbare Konzentrationsbereiche entstehen.
- d) Die Mikro-Pipetten können von den Mikro-Reaktoren getrennt werden, wodurch wiederverwendbare Vorrichtungen für diese Mikro-Maßanalyse entstehen. So läßt sich beispielsweise ein entsprechender Multi-Mikro-Pipetten-Block mit unterschiedlichen Volumina mit Injektionsöffnung herstellen, bei dem durch Injektion des Titrators (einschließlich des Indikators und Hilfsstoffe) alle Pipetten gefüllt werden und dann nach Aufsetzen auf die passig konstruierten Mikroreaktoren mit konstanter und bekannter Menge an Probe mittels einer Verschiebung von Spacer-Ventilen der Ausfluß der unterschiedlichen Titratormengen in die Reaktoren stattfindet.
- e) Der wiederverwendbare Mikro-Pipetten-Block nach d) nimmt die unterschiedlichen Probe-Mengen auf und die Titratormenge (einschließlich der Indikations- und Hilfsmittel) ist in den Mikro-Reak-

toren konstant. Hierbei lassen sich titratorseitig besonders einfache Papier-Teststreifen herstellen, auf die der Multi-Mikro-Pipetten-Block einfach aufgesetzt wird und alle Ventile auf Einfluß der Proben-Aliquote in die Mikro-Reaktoren mittels eines einfachen Handgriffes geschaltet werden. Beim Wechseln von einer zur anderen Probe werden einfach einige mL zur Auswaschung der letzten Probe durch den Pipetten-Block gespritzt, wodurch alle Mikro-Pipetten auch automatisch gefüllt werden. Für den Titrator muß dann ein neuer Teststreifen verwendet werden. Teststreifen aus Papier werden bevorzugt mit den Methoden der Siebdrucktechnik strukturiert und mit Reagenzien versehen.

f) Ein einziges Proben-Aliquot im Mikrolitermaßstab wird mit oder ohne chromatographische Vortrennung mittels Mikro-Kanäle, -kapillaren oder -gräben, die den Titrator mit einem genauestens bekannten Titer pro Strecke einschließlich aller notwendigen Indikatoren und Hilfsstoffe enthalten, quantifiziert.

g) Bei radialer, sternförmiger Anordnung der Variante nach d) läßt sich bei einer Multi-Analysen-Anordnung der Proben transport durch Zentrifugalkräfte beschleunigen, was zu starken Zeiteinsparungen führt.

Allgemein kann festgestellt werden, daß jede Variante der Erfindung die bestehenden Probleme der Teststreifen-Analytik und Maßanalytik (zu große Chemikalienmengen) löst und daß für derartige absolut messende Schnelltests ein großer Markt existiert.

Eine besondere Variante ist auch bei der Analyse organischer Moleküle möglich, wenn als Titrator entsprechende, nicht an der Bindungsstelle abgesättigte Antikörper-Moleküle für den Analyten in Form von Mikro-Affinitätssäulen unterschiedlicher, aber genau bekannter Kapazität verwendet werden. Hier entspricht die Durchbruch-Konzentration dem Äquivalenzpunkt. Als Indikator können dann u. a. die selektiven Mischungen der Gasprüfrohre verwendet werden. Alternativ können auch Mikro-Affinitätssäulen konstruiert werden, bei denen die dort eingebrachten analytspezifischen Antikörper-Moleküle an den entsprechenden Bindungsstellen mit einer derivatisierten Form des Analyten zu 100% abgesättigt sind, wobei aber der eigentliche Analyt eine wesentlich höhere Affinitätskonstante als sein Derivat aufweist. Erfindungsgemäß sollte der derivatisierte Molekülbereich des Analyten mittels maßanalytischer Methoden erfaßbar sein. So läßt sich beispielsweise an das Analytmolekül eine stabile Redox-Gruppe (z. B. Ferrocen, Ascorbat, Chinon, etc.) in einheitlichem Redoxzustand kovalent anknüpfen. Diese Redox-Gruppe wird im Verlauf der Parallel-Reaktion stöchiometrisch proportional zum Analytgehalt aus der Mikro-Affinitätssäule verdrängt und kann dann wie oben erläutert durch entsprechende Redox-Reagenzien in der Mikro-Reaktoren genauestens in Äquivalenten (Mol-Einheiten) erfaßt werden. Natürlich läßt sich erfindungsgemäß die Affinitätssäule auch mit der Mikro-Pipette vereinigen. Beispiel hierfür sind die sog. Capillary Fill Devices, die mit einer nachteilhaften fluorimetrischen Relativmethode, die wieder Intensitäten genau messen muß, im Handel sind.

Der Fachmann kann sich nun die verschiedensten Titrationsarten (z. B. Säure-Base, Redox, komplexometrische Titrations, Fällungstitrations, Affinitäts-Präzipitation) umgesetzt in progressiven, inkrementellen Se-

rien von Mikro-Titrationszonen und/oder — räumen vorstellen, deren Anzahl bei steigender Menge eines Abfangreagenzes dort bei einem gegebenen generellen Analyt-Indikator für die Analytkonzentration steht.

Im folgenden sind einige erfindungsgemäße Beispiele aufgeführt. Da die Erfindung ein komplettes, modulares und extrem variierbares System betrifft, können aus Platzgründen, hier nur wenige Ausführungsbeispiele genauer beschrieben werden.

Ausführungsbeispiel 1

Generelle, vorteilhafte Aufbau-Versionen der erfindungsgemäßen modularen Vorrichtung mit einer elektrochemischen Indikation

Der bevorzugte Aufbau für Übersichtsmessungen besteht in einer planaren, teststreifenförmigen Anordnung aus einem durchsichtigen Kunststoff mit den Abmessungen ca. $1 \times 0,5 \times 10$ cm (B \times H \times L) wie der Abb. 1 schematisch skizziert ist. Die vorliegende Test-Anordnung besteht aus einem Probennahme-Modul mit einem Array von erfindungsgemäßen Mikro-Pipetten (1) mit konstantem und genau bekanntem Volumen im Mikroliterbereich. In diesem Beispiel ist die Skalierung (5) der maßanalytischen Mikro- oder Nano-Äquivalente des Titrators, der sich in den Mikroreaktoren (4a) befindet, wegen des durchsichtigen Materials auf dem Probennahme-Modul angebracht. Sie kann aber auch auf der Unterseite des Titrations-Moduls (unten) angebracht sein. Die Mikro-Kapillaren (1) werden mit einer Trennfolie (2) unten abgedichtet. Eine Anordnung mit Dornen (3) und Verbindungskanälen zu den einzelnen Mikro-Reaktoren im Mikroliterbereich erlaubt ein rasches Durchstoßen der Trennfolie (2). Das Volumen der Mikro-Reaktoren muß ausreichend groß sein, die Proben-Aliquote ohne Verlust aufzunehmen.

Anstelle der visuellen Äquivalenzpunktsfeststellung mit Hilfe eines geeigneten Indikators in den Mikro-Reaktoren kann auch eine hier nicht abgebildete elektrochemische Indizierung durchgeführt werden. Im Falle einer elektrochemischen Indikation der maßanalytischen Titration in den isolierten Mikro-Reaktionsräumen mittels entsprechender Mikroelektroden finden die mikrochemischen, maßanalytischen Umsätze in einem darüber befindlichen Modul statt. In diesem Fall kann auf Indikatoren verzichtet werden. Die Proben-Aliquote fließen vielmehr nach der maßanalytischen Reaktion in einem separaten Modul in das wiederverwendbare Meß-Modul mit einer der Anzahl der Mikro-Reaktoren entsprechenden Anzahl von elektrochemischen Meßzellen. Jede dieser Meßzellen kann über im Boden eingelassene Kontakte elektrisch kontaktiert und bezüglich Leitfähigkeit, pH- oder Redox-Wert vermessen werden. Der elektrochemische Äquivalenzpunkt-Leser ist nach Spülen wiederverwendungsfähig. Er wird durch ein paßgenaues Aufsetzen von Reaktions-Module, evtl. Probenvorbereitungsmodul und Probennahme-Modul wieder zu einer Schnell-Test-Anordnung komplettiert.

Die Abb. 2 zeigt schematisch den Aufbau eines Probennahme-Moduls mit variablen aber genau bekannten Volumina der Kapillar-Pipetten (1). Die keilförmige Form auf Abb. 2 ist nicht maßstäblich. Zusätzlich zur variablen Länge der Kapillar-Pipetten, kann natürlich auch ihr Durchmesser verändert werden, so daß man die Aliquotisierung um den Faktor ca. 100 verändern kann. Bei zu langen Kapillar-Pipetten muß allerdings zu einer anderen Produktionstechnik als dem LIGA-Verfahren

übergangen werden. Hier müssen die engen Röhrchen gebohrt werden, was durch klassische Feinwerktechnik aber auch mittels Laser geschehen kann. Das auf Abb. 2 gezeigte Probennahme-Modul mit variabler Aliquotisierung kann wiederverwendet werden. Dazu wird sie jeweils mit der neuen Probe mittels einer Spritze durchgespült. Dazu sind die beiden Abdeckplatten mit den Verbindungs-Kapillaren (6) mittels Führungsschienen so angebracht, daß sie abwechselnd unten und oben die Kanäle verbinden. Wegen der variablen Proben-Aliquotisierung, können bei diesem Schnell-Test-System die maßanalytischen Titer in den Mikro-Reaktoren (4b) im Titrations-Modul konstant bleiben. Die einzelnen Mikro-Reaktoren werden mit den einzelnen Proben-Aliquoten dadurch simultan gefüllt, daß die beiden Abdeckplatten mit den Verbindungskapillaren (6) seitlich verschoben werden. Die Mikro-Reaktoren des Typs (4b) können auch auf einem papierähnlichen Träger untergebracht werden.

Dadurch gestaltet sich beispielsweise eine Schnell-Analyse mit einer Kombination: Variable Probenmenge, konstanter Titer in den Mikro-Reaktoren wie folgt: a) Eintauchen des Probennahme-Moduls in die Probe b) Aufsetzen desselben auf das elektrochemische Meß-Modul unter Dazwischenschaltung einer passenden Folie mit den an den richtigen Stellen punktförmig immobilisierten konstanten Mengen Titrationsmittel, c) Öffnen der Probenkanäle und der Versiegelung des maßanalytischen Reagenzes und Überspülen in die Meßzellen, c) Vermessung des Meßzellen-Arrays zur Feststellung des Ortes der stärksten Meßsignal-Änderung, d) Ablesen der dort vorliegenden Äquivalenz-Konzentration an Analyt.

Eine weiter generell Ausführungsvariante ist auf der Abb. 7 gezeigt. Die Mikro-Kapillar-Pipetten (1 Aufsicht und Seitensicht) können mit den Mikro-Reaktoren (4a) mit variablen Volumen durch paßgenaues Verschieben in Verbindung gebracht werden. Eine dreidimensionale Darstellung eines Mikro-Reaktors ist in (12) gezeigt. In Abb. 7 unten ist eine Komposit-Anordnung von zwei Modulen gezeigt. Das Probennahme-Modul (13) besteht aus einem Keramik-Spritzguß, in dem die Pipetten-Kanäle gebohrt sind. Die immobilisierten Reagenzien (14) für eine Probenvorbereitung sind in einer Ecke untergebracht. Die Oberfläche (15) ist hydrophobiert. Das Trägermaterial (16) wird mit einer Bodenplatte (17) abgeschlossen.

Die Abb. 8 zeigt schematisch die Aufsicht und die Seitenansicht eines weiteren Moduls mit noch geschlossenen Mikro-Kammern, die bei Bedarf geöffnet werden.

Ausführungsbeispiel 2

Die genaue Bestimmung einer Säure- oder Basenkonzentration mittels einer Systemkonfiguration mit Einzel-Reaktoren

Auf einem planaren Träger aus einem preiswerten, der LIGA-Technologie zugänglichen Material wird gemäß Abb. 1 ein lineares Array von Mikro-Reaktionskammern mit ansteigendem Volumen und mit ihnen in Verbindung stehenden Kapillar-Füll-Pipetten erzeugt der Gesamtabmessungen $10 \times 1 \times 0,5$ cm (L \times B \times H). Zur Erleichterung der reproduzierbaren und automatisierbaren Füllung der Mikro-Kammern (Reaktoren mit Füllvolumen im Mikro- und Nanolitermaßstab, hier Durchmesser 0,1 mm) können diese auch mit unten offenen Kammern produziert werden, die dann nach Fül-

lung mittels der verschiedensten Techniken mit einer optisch durchlässigen Bodenplatte verschlossen werden. Die Füllung mit genau dem Kammervolumen entsprechenden Mengen des Titrators (bei der Säurebestimmung: Lauge; bei der Laugenbestimmung: Säure) geschieht beispielsweise mittels eines Dispensers aber auch durch einfache Tauchfüllung in einer vorzugsweise gelartig vorliegenden Standardlösung einer schwerflüchtigen Lauge oder Säure, der ein geeigneter pH-Indikator beigelegt ist. Beispiele für immobilisierte Laugen sind neben den bekannten alkalischen Ursubstanz- 5 stoffen wie Alkalikarbonate auch Substanzen, wie stark oder schwach basische Ionenaustauscher, die an ihrer Oberfläche (z. B. mittels Amino-Gruppen) Protonen binden können. Beispiele für immobilisierte Säuren sind dementsprechend neben den klassischen sauren Ursubstanz- 10 stoffen wie Hydrogensulfat und -phosphat u. a. stark oder schwach saure Ionenaustauscher (z. B. mit SO_3H -Gruppen). Alternativ lassen sich natürlich auch Titrationen im Nanolitermaßstab durchführen, wenn der Titrator nur kovalent an den unterschiedlich großen Kammeroberflächen angebunden ist.

Wird eine derartige Testvorrichtung in die zu messende Probe getaucht, dann werden erst einmal gleichzeitig alle, je nach gewünschter Graduierung mehr oder weniger zahlreiche, Mikro-Pipetten durch die Kapillarwirkung gefüllt. Nach dem Herausziehen der Test-Vorrichtung wird der weitere Transport der Probe in die im Ausführungsbeispiel 2 jeweils darunter liegende Mikro-Titrations-Kammern dadurch gestartet, daß entweder eine Verschlussfolie durchstoßen wird oder die Mikro-Reaktoren in Titrations-Modul sind mit einer sich selbst auflösenden Schicht abgedeckt. Alternativ kann auch erst eine kontrollierte Verschiebung des Probenahme-Moduls den Weg zur Titration öffnen. Dann reagiert der Analyt mit der dort jeweils vorliegenden und genau bekannten Menge des Base- oder Säure-Standards, wobei es je nach der Säure- oder Basenkonzentration in der Probe zu einer Veränderung der Indikatorfärbung dort und nur dort kommt, wo die Äquivalenz überschritten ist. An einer seitlich angebrachten Skala läßt sich dann die Absolutkonzentration des Analyten (hier Säure oder Base) genau ablesen. Der Probentransport kann ebenfalls durch eine mechanisch oder andersartig eingeleitete Kapillarwirkung aber auch durch Eintauchen in eine Art Entwicklungsflüssigkeit mit oder ohne Hilfsreagenzien geschehen. Auch eine Befüllung der Mikro-Reaktions-Kammern mittels Vakuum oder Überdruck ist denkbar und erfindungsgemäß nebensächlich. Durch die Wahl eines geeigneten und einheitlichen pH-Indikators, der der zu bestimmenden Säure- oder Basenstärke (pK-Wert) entspricht, liegen einheitliche Anfärbereiche (Kette der Mikroreaktionen mit oder ohne stöchiometrischen Analyt-Überschuß) vor, die auch automatisiert als digitale Ja-Nein Antwort (bezüglich der Erreichung des Endpunktes) ausgewertet werden können, was eine hohe Genauigkeit garantiert.

Bei dieser Analysenmethode wird in dem hier vorgestellten Ausführungsbeispiel die klassische Titration einer zu bestimmenden Säure mit einer Lauge (oder umgekehrt) in eine Serie von parallel und getrennt ablaufenden Mikrotitrations kontrolliert variiert Titrationsmengen verwandelt, die durch die Art ihrer Anordnung eine digitale oder streckenmäßige Auswertung ähnlich wie die Volumenablesung an einer Bürette ermöglichen. Der Vorteil liegt einmal darin, daß in diesem Beispiel eigentlich nur die Position der noch gerade angefärbten Zone mit dem höchsten immobilisierten Laugengehalt

zur genauen Konzentrationsermittlung genügt, die anderen also redundant sind und daß die Intensität nicht mehr wichtig ist. Im Falle der pH-Wert Messung, die bei starken Säuren und Laugen ungenau wird, ist diese "Flächentitrationsart" wesentlich genauer. Diese Art von Barcode-Analyse hat in den LED-Leuchtketten zur Intensitätsanzeige bestimmter elektronischer Signale ihren Gegenpart.

Die herstellungsmäßig genau konfektionierten Titrations-Module für eine absolute Konzentrationsbestimmung von Säuren und Laugen können erfindungsgemäß natürlich auch zur Gas-Analyse verwendet werden. So setzt man beispielsweise Kohlendioxid in einem Mikro-Gaswäscher-Modul mit bekannten Mengen von Natronlauge um. Die Abnahme der NaOH-Konzentration ist so leicht feststellbar. Analog kann Ammoniak mittels HCl ausgewaschen und bestimmt werden.

Ausführungsbeispiel 3

Absolute Serien Bestimmungen von Säuren und Laugen mittels einer Systemkonfiguration: Titration in Reaktions-Kanälen

Hat man eine Vielzahl von Proben auf ihre Säure- oder Basekonzentration hin zu überprüfen, so sieht eine bevorzugte Form der Erfindung anders aus. Auf einem geeigneten, mikrostrukturierbaren Träger befinden sich pro Analyse eine Aufgabevorrichtung, die mit einem darunter liegenden engen Mikro-Kanal genauer Abmessungen in Verbindung steht. Der gesamte Querschnitt dieses Kanals ist lückenlos mit dem Titrator-Standard-Reagenz, dem auch noch ein geeigneter pH-Indikator beigelegt ist, gefüllt. Die Bodenplatte kann wieder, wie oben gezeigt, optisch durchlässig gewählt werden. Bei dieser Version wird die Analysenprobe mittels einer genauen und speziellen Mikroliterspritze über das Aufgabe-Port-System in den Kanal als kontinuierliche Mikro-Reaktionskammer gedrückt, wobei der Probepropfen mittels einer kurzen Nachspülung mit dergleichen oder einer zweiten Spritze in den Kanal gedrückt wird. Hier läuft mit dem dort gleichmäßig immobilisierten Titrator die Neutralisationsreaktion solange ab, bis der stöchiometrische Titratorüberschuß abgebaut ist. Dies läuft wie im obigen Beispiel auf das Ausmessen einer Mikro-Kanal-Strecke mit bekanntem Titer hinaus, was ein absolutes, an einer Skala ablesbares Ergebnis ergibt. Alternativ kann man auch erst alle Probenports mit einem Probenaliquot im Mikroliter-Maßstab füllen und dann die ganze Multi-Analysen-Vorrichtung in eine Lösung tauchen, damit es zu einem Probentransport durch die Reaktionskanäle mittels Kapillarkräften kommt. Die Art des Transportes ist erfindungsgemäß unerheblich. Eine bevorzugte Ausführungsform benutzt dazu, wie in Abb. 6 skizziert, entsprechend getränktes Fließpapier. Unter Zuhilfenahme eines geeigneten Spacers läßt sich diese Ausführungsform auch in einer Heißklebefolie einschweißen, was den Flächen-Titer stabilisiert.

Ausführungsbeispiel 4

Bestimmung eines Analyten mit Redox-Eigenschaften durch eine Systemkonfiguration: "zweidimensionale Redox-Titration"

In einer Vorrichtung wie unter Beispiel 2 oder 3 be-

schrieben, werden bei der Bestimmung eines Oxidationsmittels die üblicherweise dazu verwendeten Reduktionsmittel in den Mikro-Reaktoren immobilisiert. Bei der Bestimmung eines Reduktionsmittels wird umgekehrt ein geeignetes Oxidationsmittel dort in bekannter Menge untergebracht. Als Indikator werden die bekannten Redox-Indikatoren verwendet. In einigen Fällen zeigt sich der chemisch umgesetzte oder noch im Überschuß vorliegende Redox-Titrator auch selbst an. Beispiele dafür sind Permanganat, Chromat, Jod usw. . . Oxidationsmittel mit einem Standardpotential positiver als + 0,35 V (GKE) lassen sich mit immobilisiertem Kaliumjodid und etwas Stärke (z. B. 0,05 M KJ mit 5% Stärke) sehr gut mit beiden Vorrichtungen absolut quantitativ bestimmen, wenn ein stärker reduzierend wirkendes Reduktionsmittel als Titrator damit zusammen immobilisiert wird. Sehr häufig muß bei biochemischen Verfahren Wasserstoffperoxid gemessen werden. Dies gelingt mit der hier beschriebenen, erfindungsgemäßen Systemkonfiguration sehr genau. Erst nach Überschreiten des Äquivalenzpunktes der Reaktion mit dem immobilisierten Reduktionsmittel liegt freies Wasserstoffperoxid vor, das elementares Jod erzeugt, was mit der Stärke zu einer intensiven Schwarzfärbung führt. Als Reduktionsmittel können alle stabil in den Mikro-Reaktoren zu immobilisierenden Reduktionsmittel, wie z. B. Titan(III)-, Eisen(II)-salze, Arsenit, Thiosulfat, Oxalat, Ascorbinsäure o. a. auch zusammen mit geeigneten anderen Redox-Indikatoren verwendet werden. Eine absolute quantitative Bestimmung von Wasserstoffperoxid ist für alle Biosensoren, die auf Oxidasen beruhen sehr interessant.

Bei der quantitativen Bestimmung von Analyten mit reduzierenden Eigenschaften werden erfindungsgemäß Oxidationsmittel mit einem entsprechend positiveren Redox-Potential in den Mikro-Reaktionskammern immobilisiert. Besonders vorteilhafte, einfache Ausführungsformen erhält man wenn man einen selbstindizierenden Stoff wie etwa Kaliumpermanganat oder Ce(IV)-Salze, die im UV-Licht fluoreszieren, dazu verwendet. Auch Chromat verändert dabei seine Farbe von gelb nach grün.

Ausführungsbeispiel 5

Bestimmung von anorganischem Phosphat durch Ausfällen als Aluminiumphosphat mit einer Systemkonfiguration: Fällungs-Reaktor

Hier wird als Titrator Aluminiumsulfat in einer sauren Umgebung verwendet. Die freien Aluminiumionen ergeben mit immobilisierten Morin unter UV-Bestrahlung eine intensive grüne Fluoreszenz. Werden die maßanalytischen Aluminium-Ionen zunehmend vom Phosphat als unlöslicher Aluminiumphosphat-Niederschlag aus dem Lösungsgleichgewicht entfernt, verlöscht diese Fluoreszenz. Kurz vor Erreichen des Äquivalenzpunktes besteht hier eine lineare Beziehung zwischen der Fluoreszenz und dem Restgehalt an Aluminium, die man bei einer quantitativen Intensitätsmessung zu Extrapolations-Rechnungen verwenden kann (Prinzip: Standard-Subtraktion). Alternativ kann aber der Endpunkt dieser maßanalytischen Fällungs-Titration auch mittels bekannter Adsorptions-Indikatoren, die den Endpunkt empfindlicher anzeigen, angezeigt werden.

Ausführungsbeispiel 6

Bestimmung eines Schwermetalls durch eine Systemkonfiguration: komplexometrische Titration

a) Bestimmung von Cadmium

Als Titrator wird entsprechend immobilisiertes EDTA verwendet. Der Titer pro Mikro-Reaktor muß bei Proben-Aliquoten von 0,1 mL im Nano-Äquivalent-Bereich liegen, wenn Proben im ppm Bereich gemessen werden sollen. Der ebenfalls mit zu immobilisierende Puffer soll bei pH > 9 liegen. Als Indikator wird das Reagenz-Cocktail verwendet, das auch bei der trocken-chemischen kolorimetrischen Teststreifen-Methode verwendet wird. In der oben erwähnten Literatur sind noch weitere selektive Indikatoren für Cadmium erwähnt.

b) Bestimmung von Fluorid

Als Titrator dient in diesem Fall das intensiv rot gefärbte Eisen(III)rhodanid, das im Verlaufe der zweidimensionalen Titration durch die Bildung eines starken Eisen-Fluor-Komplexes entfärbt wird. Der Titrator ist also selbstindizierend. Soll das Fluorid im ppm-Bereich gemessen werden, so sind Probenvolumina von 0,1 mL und Titrator-Konzentrationen im Nano-Mol-Bereich pro Mikro-Reaktor erforderlich.

Ausführungsbeispiel 7

Die Bestimmung eines Antikörper / Antigen Partners mittels der Systemkonfiguration: Mikro-Kanal-Säule

Diese Ausführungsvariation entspricht einer Fällungs- oder komplexometrischen Titration. Bei der quantitativen Bestimmung eines Antikörpers dient das Antigen immobilisiert auf einer Oberfläche als Titrator. Es liegt in den Mikro-Reaktions-Kammern oder Kanälen als Assoziat mit einem farblich markierten Antikörper mit niedrigerer Affinitätskonstante als der Analyt vor, so daß es durch letzteren freigesetzt wird und wegdiffundieren kann, wodurch es zu einem Verschwinden der Kammeranfärbung kommt. Die Wegdiffusion läßt sich unter Ausnutzung von kapillaren Saugkräften beschleunigen. Aus Gründen der Empfindlichkeit wird zur Markierung vorzugsweise eine fluoreszierende Verbindung verwendet.

Ein Antigen als Analyt wird analog mit dem dazugehörigen Antikörper als Titrator bestimmt. Letzterer wird abgesättigt mit einem markierten Antikörper, der eine kleinere Affinitätskonstante als der eigentliche Analyt aufweist.

Ausführungsbeispiel 8

Durchführung von Immuno-Assays mit Enzym-Markierung mittels der Systemkonfiguration ELISA

Hier wird nach dem Probennahme-Modul ein Immunoreaktor-Modul geschaltet. In den Mikro-Reaktoren dieses Moduls befindet sich der Analyt in enzymmarkierter Form an seinen Partner gebunden. Letzterer ist selbst kovalent an einer Oberfläche gebunden. Nach Öffnung der Verbindungskanäle zwischen beiden Modulen, verdrängt der stärker gebundene Analyt sein en-

zymmarkiertes Derivat aus den Bindungsstellen, wodurch die Enzymmarkierung mobil wird und mit einer kleinen Menge Flüssigkeit in das Quantifizierungs-Modul gefördert werden kann. Dort reagiert es eine bestimmte Zeit mit dem dazugehörigen Substrat bevor die dabei erzeugten oder verbrauchten Substanzen im Titrations-Modul genau erfaßt werden. Bei Verwendung von Glucose-Oxidase als Markierungs-Enzym kann der Titrations-Modul wieder aus einem Bestehen, das auch zur Messung von Wasserstoffperoxid verwendet wird.

Ausführungsbeispiel 9

Bestimmung des chemischen Sauerstoff-Bedarfs (CSB-Wert) und des TOC-Wertes mit einer speziellen, anwendungsspezifischen Systemkonfiguration

Eine besondere Ausführungsform einer säure- und hitzebeständigen, mit Dichromat beladenen Probenvorbereitungs-Modul kann die extrem umweltbelastende klassische CSB-Bestimmung nach DIN ersetzen und gleichzeitig auch den TOC-Wert liefern. Die einzelnen Mikro-Reaktoren enthalten variable Chromat-Mengen im Mikro-Mol Bereich. Sie können durch eine geeignete Mikro-Verbindungskanal-Schaltung durch kontrolliertes Verschieben der Module gegeneinander und entsprechender Spacer mit Mikro-Gaswäscher-Reaktoren zur Messung des entstandenen Kohlendioxids in Verbindung gebracht werden. Die Mikro-Gaswäscher enthalten in diesem Fall variable Mengen NaOH mit dem Indikator Phenolphthalein. Nach der Probennahme einer angesäuerten Probe werden die Aliquote (Anzahl entsprechend der gewünschten Genauigkeit) in den Oxidations-Modul überführt. Dann wird durch Verschiebung des letzteren die Verbindung zu den Kapillarpipetten unterbrochen und die zu den einzelnen Mikro-Gaswäschern geöffnet. Dann wird das System für zwei Stunden (DIN) in den Trockenschrank bei 100°C depotiert. Um ein Eintrocknen zu verhindern, muß Wasser angeboten werden. Dazu wird entweder eine Wanne um die Probenahme-Kapillare gelegt, die Vorrichtung in ein Wasserbad gestellt oder die Erwärmung mit Wasserdampf durchgeführt. Während der Erwärmungsphase oxidiert das Dichromat die in dem Proben-Aliquot vorhandenen oxidierbaren Bestandteile, u. a. auch organische Verbindungen und wird dabei selbst zu einer grünen Chrom(III)-Verbindung reduziert. Dies passiert in allen Mikro-Reaktions-Kammern, in denen das Chromat in einem stöchiometrischen Überschuß vorliegt. Zur Steigerung der Empfindlichkeit können auch noch geeignete Indikatoren für Chromat oder redox-empfindlich zugesetzt werden. Der CSB-Wert kann direkt an einer Skala, die sich neben dem Array der Mikro-Oxidations-Kammern befindet, in mg O₂/L abgelesen werden. Dieses Verfahren reduziert den Sondermüllabfall des DIN-Verfahrens um mehrere Größenordnungen. Simultan kann aber auch der Mikro-Gaswäscher lokalisiert werden, wo das Phenolphthalein gerade farblos wird. Hier kann dann an einer separaten Skala der TOC-Wert in absoluten Einheiten abgelesen werden.

Ausführungsbeispiel 10

Wasserbestimmung nach Karl Fischer mittels einer speziellen lösungsmittel-beständigen Systemkonfiguration

Eine weitere besondere Ausführungsform stellt auch

eine Vorrichtung zur Wasserbestimmung in organischen Lösungsmitteln dar. Hier werden die bekannten Karl-Fischer-Reagenzien in den Mikro-Reaktoren unter wasserfreien Bedingungen in variabler Menge immobilisiert. Die in die Kammern eindringenden Wasserspuren in den zu prüfenden Flüssigkeiten reagieren stöchiometrisch mit dem Karl Fischer Reagenz, wobei Jod vierwertigen Schwefel zu sechswertigem aufoxidiert und dabei zu Jodid reduziert wird. Sobald also ein stöchiometrisch äußerst geringer Überschuß an elementarem Jod vorliegt, hat alles Wasser in den Proben-Aliquoten ausgereagert. Dieser Punkt wird durch die Verwendung von Stärke noch ausgeprägter angezeigt.

Ausführungsbeispiel 11

Absolut anzeigender Biosensor für Glucose mittels der Systemkonfiguration: Enzym-Reaktor

Zur Demonstration der überaus großen Bandbreite von Möglichkeiten, absolut messende Testanordnungen im Sinne der vorliegenden Erfindung herzustellen, wird hier stellvertretend ein Glucose-Sensor beschrieben. Wegen der gewünschten Kalibrationsfreiheit muß die gesamte, in dem genommenen Proben-Aliquot vorhandene Glucose mit Hilfe des Enzyms Glucose-Oxidase (GOD) zu Gluconsäure und Wasserstoffperoxid umgesetzt werden. Daher ist eine entsprechend kleine Blutmenge (im Mikroliterbereich) und eine ausreichende Menge GOD im Enzym-Mikro-Reaktor zu verwenden. Als Mikro-Reaktions-Kammer eignet sich hier wegen der meist limitierten Probenmenge (1 Tropfen Blut) besonders die Version der Erfindung, die auf einer Mikro-Kanal-Anordnung beruht. Die Blutprobe wird über eine Kapillar-Füll-Pipette aliquotisiert und in die Vorrichtung eingebracht. Von dort aus fließt die Probe analog Abb. 6 durch eine Zone mit immobilisierter GOD, die sich auch bereits innerhalb des Mikro-Reaktions-Kanals befinden kann. In diesem Kanal soll die stöchiometrisch aus Glucose entstandene Wasserstoffperoxid-Menge quantitativ durch "Titration" mit Standard-Reduktionsäquivalenten bestimmt werden. Als Reduktionsmittel wird vorzugsweise ein Gel mit einem definierten Kaliumjodid-Gehalt verwendet. Als Indikator wird vorzugsweise Stärke verwendet. Die Blutprobe strömt filtriert oder unfiltriert (der GOD-beladene Mikro-Reaktor wirkt für die roten Blutkörperchen wie ein Filter) in den Titrations- und Meß-Kanal. Dort reagiert das gebildete Wasserstoffperoxid mit dem maßanalytischen Reduktionsmittel zu elementarem Jod, das durch die bekannte Jod-Stärke-Reaktion tiefschwarz gefärbt ist, solange bis die Gesamtmenge an Wasserstoffperoxid umgesetzt ist. Dabei wird eine der Konzentration streng proportionale Strecke des Titrationskanals schwarz gefärbt. Die in der Blutprobe vorhandene Glucosekonzentration kann an einer aufgedruckten Skala in mg/dl oder einer anderen Konzentration abgelesen werden (Ende der Schwarzfärbung). Alternativ kann das Wasserstoffperoxid auch durch einen Standard aus Kaliumpermanganat aufoxidiert werden, wobei das Kaliumpermanganat zu farblosem Mangan(II) entfärbt wird.

Da z. B. Kaliumjodid und Kaliumpermanganat Ursubstanz sind, ergeben sich hierdurch generische und absolut anzeigende Testvorrichtungen für eine große Vielzahl von Stoffen, die mit ihren Oxidasen selektiv unter Bildung von Wasserstoffperoxid oxidiert werden können.

Selbstverständlich müssen die Mikro-Reaktoren in

beiden oben skizzierten Anwendungsbeispielen neben einer Standardmenge an Titrationsreagenz auch noch ein geeignetes Puffer- und Stabilisierungs-Cocktail enthalten, deren optimale Zusammensetzung zu finden aber für einen Fachmann kein Problem darstellt. Alternativ kann bei Oxidasen auch die Abnahme der Sauerstoffkonzentration mittels eines Fluoreszenz-Signales eines Farbstoffes, das durch Sauerstoff gequenchet wird, gemessen werden.

Ausführungsbeispiel 12

Quantitatives Gas-Dosimeter (Passiv-Proben-Sammler) mittels einer besonderen Systemkonfiguration mit Gas-Diffusions-Sammlern

Hierbei wird ein spezielles Probennahme-Modul mit engen, langen Diffusions-Mikro-Röhrchen verwendet. Sie stehen im unmittelbaren Kontakt zu einer Sammelphase in einem weiteren Modul, in dem der gasförmige Analyt chemisch gebunden wird. Nach einer vorgeschriebenen Sammelzeit wird der Analyt in seiner neuen Verbindungsform durch Füllen der Diffusions-Röhrchen mit einer geeigneten Flüssigkeit aus der Sammelphase gewaschen und die Menge der aus dem Gas neu gebildeten Verbindung mit oder ohne chromatographische Trenn-Operationen titrimetrisch erfindungsgemäß durch eine geeignete stöchiometrische Reaktion mit Äquivalenzpunkt-Anzeige bestimmt.

Beispielsweise läßt sich ein Ozon-Dosimeter einfach dadurch aufbauen, daß als Sammelphase ein maßanalytisches Reduktions-Äquivalent gewählt wird und als Indikator KJ plus Stärke. Der Mikro-Reaktor im Titrations-Modul, der schwarz gefärbt ist, zeigt an, daß die gesammelte Ozon-Konzentration dem letzten, benachbarten Reduktions-Äquivalent entspricht.

Patentansprüche

1. Verfahren und Vorrichtungen für ein modulares Mikrosystem für hochgenaue chemische Schnell-Analysen und Verfahren zur Herstellung, dadurch gekennzeichnet, daß zur Quantifizierung des zu bestimmenden Stoffes (Analyt) maßanalytische, parallel und stöchiometrisch bekannt ablaufende Mikro-Reaktionen von genau bekannten Proben-Aliquoten mit oder ohne zusätzliche, integrierte, empfindlichkeits- und selektivitäts-steigernde Analyt-Erkennungsreaktionen und/oder Mikro-Trenn-Operationen mit genau bekannten chemischen Äquivalenten eines geeigneten, chemisch stabilen und hinreichend selektiven Reagenzes (maßanalytischer Titrator) und einer geeigneten Indikator-Hilfsstoff-Mischung inkrementell in Mikro-Reaktionsräumen an unterschiedlichen Orten mit unterschiedlichen Mengen (ortsabhängiger Titer) durchgeführt werden und die Quantifizierung auf die Ortsbestimmung eines optisch leicht zu erkennenden Indikator-Umschlages oder mikro-elektrochemisch feststellbaren Punkt hinausläuft, wo die aktuell vorliegende chemische Äquivalenz-Menge des Analyten in absoluten Mol-Einheiten einfach und genau, entsprechend der gewählten Graduierung des immobilisierten Titrators abzulesen ist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als selektivitätssteigernde Analyt-Erkennungs-Reaktion biochemische Reaktionen, die nach dem Schlüssel-Schloß-Prinzip ablaufen, insbe-

sondere eine enzymatische oder immunologische mit Redox-Derivaten und/oder ELISA-verfahrens-analog und/oder amplifizierende (beispielsweise durch Substrat Zyklisierung oder mittels der PCR-Technik o. ä.), der maßanalytischen Quantifizierung vorgeschaltet sind, und ein dabei stöchiometrisch freigesetzter, analyt-äquivalenter, d. h. mengenmäßig streng proportionaler, weiterer Stoff nach dem vorliegenden Verfahren bestimmt wird, was in den beiden erstgenannten biochemischen Reaktionsarten einen 100%igen Stoff-Umsatz des Analyten erfordert.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der inkrementellen maßanalytischen Analyt-Quantifizierung der Proben-Aliquote eine anwendungsspezifische, unterschiedliche Operation vorgeschaltet ist, welche die bekannten, analytisch-chemischen "Unit-Operations", wie gasflüssig, flüssig-fest Trennungen über entsprechende Membranen oder Filter aber auch chromatographischer Art (z. B. GC, LC, IC, RP-LC, Gel, Affinität etc.) oder Extraktionen, Gaswäsche etc. in speziellen Modulen in integrierter Mikrotechnik durchführt.

4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die inkrementellen maßanalytischen, mikrochemischen Quantifizierungs-Reaktionen eines aufgegebenen, bekannten Proben-Aliquot mit optischer Äquivalenzpunkts-Ermittlung und eines ortsabhängigen Reagenz-Titers kontinuierlich (bekannter Titer pro Strecke) durchführt, was beim Vorschalten chromatographischer Trenn-Operationen oder biochemischer Analyt-Erkennungsreaktionen vorteilhaft ist, weil in diesen Fällen eine geeignete mobile Phase injiziert wird, die den Analyten nach der Abtrennung von störenden Begleitstoffen oder nach quantitativer Umsetzung einem geeigneten Mikro-Bioreaktor in die Quantifiziersäule transportiert, wo er oder sein biochemisches Äquivalent längs eines genau dimensionierten Mikro-Kanals ein dort immobilisiertes, maßanalytisches Reagenz konstanter oder ansteigender Äquivalenzmenge aber bekannter Menge (Titer pro Strecke) mit bekannter Stöchiometrie zu 100% umsetzt und dadurch eine Indikator-Umschlag bis zu diesem Punkt erzeugt.

5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der maßanalytische, chemische Umsatz mit einem geeigneten Analyt-Titrator und Indikator in Präzisions-Mikro-Kanälen in beiden Längsrichtungen durch Diffusion erfolgt und zur Auswertung die Anfärbe- oder Indikator-Umschlags-Breite, anstelle einer Intensitätsmessung genommen wird, wobei Multi-Analyt-Anordnungen teststreifenförmig gestaltet werden, so daß die analytkonzentrations-proportionale Farbstreifen-Breiten mit Bar-Code-ähnlichen Lesern einfach, schnell und zuverlässig ausgewertet werden und bei Verwendung von fluoreszierenden Indikatoren im Bereich 800—1100 nm implantierbare, von außen ablesbare, medizinische Test-Vorrichtungen ermöglicht werden.

6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die inkrementellen maßanalytische, mikrochemische Quantifizierungs-Reaktion von parallel, mittels eines Arrays von Mikro-Pipetten (oder Mikro-Gas-Mäusen) genommenen Proben-Aliquoten bekanntem Volumens diskontinuierlich aber simultan in eng begrenzten, voneinander che-

misch isolierten Mikro-Reaktionsräumen an unterschiedlichen Orten durchgeführt wird, wobei die in den einzelnen Mikro-Reaktoren immobilisierte Menge eines chemisch stabilen und stöchiometrisch mit dem Analyten reagierenden Maß-Reagenzes von Mikro-Reaktor zu Mikro-Reaktor graduell variiert wird, so daß die Äquivalenz-Menge des Analyten örtlich dort in der Absolut-Einheit Mol abgelesen werden kann, wo sich die Indikatorfärbung zwischen zwei Mikro-Reaktoren verändert.

7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Durchführungs-Operationen der Schnell-Test Varianten in modularen, kompakten und integrierten, mikrochemischen Verfahrenseinheiten: Probennahme, Vorbereitung und Messung, die systembedingt beliebig kombiniert werden können, durchgeführt wird und die parallel gezogenen Probennahme-Volumina graduell und in bekannter Weise variiert werden, wobei die Mikro-Reaktoren einen konstanten oder variablen Titer enthalten, können so daß im letzten Fall bei gegenläufiger Graduierung sehr große Meßbereiche möglich werden.

8. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die bekannten Verfahren für einen trockenchemischen Schnell-Test dahingehend verbessert werden, daß zur Steigerung der Zuverlässigkeit und Genauigkeit genaue Mikropipetten verwendet werden und die Auswerttechniken der Standard-Addition oder -Subtraktion reflexionsphotometrisch automatisch angewandt werden.

9. Vorrichtung zur Durchführung der Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 8 und Verfahren zur Herstellung, dadurch gekennzeichnet, daß sie mikrochemisch, kompakt und modular entsprechend den Verfahrensschritten: a) Probennahme, b) Vorbereitung mit selektivitäts-steigernder Analyt-Erkennung und/oder biochemischer Amplifikation, c) weiteren "Unit-Operations" Funktionen, d) quantifizierende maßanalytische Messung modularartig aus einem geeigneten, preiswerten, recyclebaren Material oder verschiedenen Materialien aufgebaut ist, in dem die erforderlichen Hohlräume für die inkrementelle Maßanalyse mit hochpräzisen Abmessungen für a) die Mikro-Pipetten, b) die Mikro-Bioreaktoren und/oder Mikro-Chromatographie-Säulen, c) für weitere, notwendige chemische Reaktionen und für d) die Titrationsräume mit photolithographischen Präzisions-Verfahren oder siebdruck-basierende Dickschicht-Technik einfach und in höchster Maß-Genauigkeit massenweise produziert werden, wobei die einzelnen Funktions-Einheiten oder Module vorzugsweise getrennt hergestellt und kontrolliert gegeneinander verschiebbar laminatartig, je nach dem speziellen Schnell-Test, zu einem multifunktionellen Mikrosystem vereinigt werden und hochgenaue, vorzugsweise steckbare Paßformen eine Vielfalt an Kombinationen der Grundmodule ermöglichen, wobei die einzelnen Funktions-Module auch einzeln einer Spezialbehandlung unterziehbar sind, bzw. das Titrations-Modul auch alleine auswertbar ist.

10. Vorrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß als geeignetes, recyclefähiges Material Kunststoffe, wie z. B. Plexiglas, Polypropylen, PET, Polycarbonat, PE und andere, präzise herstellbare und/oder bearbeitbare Sorten aber auch Sili-

zium, Keramik (Green-Tape Technik), Papier oder papier-ähnliche Träger verwendet werden, wobei die Form und die Anordnung der funktionellen Hohlräume (in Serien, planaren Arrays, zeilen- und spaltenförmig, schnecken-, kreis- oder helixförmig, etc.) sowie die geometrische Form der gesamten Schnell-Test-Vorrichtung (Röhrchen, streifen- oder scheckkartenförmig, Würfel oder Polyeder mit multidimensionalen Funktionen) unerheblich ist.

11. Vorrichtung nach den Ansprüchen 9 und 10, dadurch gekennzeichnet, daß der Transport der genau bekannten Proben-Aliquote von den Pipetten im Probennahme-Modul durch die Analyt-Erkennungs- oder Amplifikations-Säulen im Vorbereitungs-Modul oder direkt in die jeweiligen Mikro-Titrationsräume im Titrations-Modul im Mikro- und/oder Millimetermaßstab erfolgt und auf kürzestem Wege mittels vorbereiteter, paßgenauer Mikro-Kanäle in den Modulen durch Kapillarkräfte und/oder Schwer- oder Zentrifugalkraft und/oder Druckunterschiede oder einer Transportlösung geschieht, und der Analyt in den maßanalytischen Mikroreaktoren chemisch und stöchiometrisch mit einem dort positionierten (immobilisierten) maßanalytischen Reagenz, dessen Menge ortsabhängig variiert, unter Verwendung eines geeigneten Farbindikators sowie weiterer Hilfsreagenzien wie Puffer, Maskierungsstoffe etc., selektiv umgesetzt wird und der Ort dieser Farbänderung durch die Grundplatte leicht feststellbar ist.

12. Vorrichtung nach den Ansprüchen 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Probennahme-Vorrichtung (Modul) aus einer oder mehreren Mikro-Pipetten besteht, die in einem geeigneten Material mit einer hydrophoben Oberfläche als Hohlraum eingelassen sind, und die einen konstanten oder variablen aber bekannten Inhalt aufweisen, wobei sie vorteilhaft mit der Präzision der massenproduktionstauglichen Mikrosystemtechnik, wie dem LIGA-Verfahren oder der Siliziumtechnologie hergestellt werden und in ihrer einfachsten Version aus röhrenförmigen Vertiefungen mit Abmessungen in der Größenordnung Mikro- oder Millimeter bestehen, die passend zu den darunter befindlichen weiteren Funktions-Modulen angeordnet sind, wodurch Hohlräume geschlossen werden.

13. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß bei der Version mit diskontinuierlicher maßanalytischer Reaktion in voneinander isolierten Mikro-Reaktoren die Mikro-Pipetten in Probennahme Modul vorzugsweise in Arrayform angeordnet sind und dadurch genau bekannte Proben-Aliquote automatisch gezogen werden, in dem die Pipetten-Öffnungen mit der flüssigen Probe in Berührung gebracht werden, wobei sie sich bis zur maximalen Füll-Volumen (= Überfließen) spontan füllen und die überschüssige Probenmenge wegen einer hydrophoben Oberfläche neben den Öffnungen nicht haften bleibt und die Mikropipetten am anderen Ende vorzugsweise zur hochgenauen Dosierung während der Probennahme verschlossen sind.

14. Vorrichtung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß der Verschuß der Mikro-Pipetten im Probennahme-Modul der Schnell-Test-Vorrichtung durch geeignete mikromechanische Ventile gebildet wird oder von geeigneten Membranen, die durch geeignete Mikrodorne von außen oder

innen durchstoßen werden können, wobei sich die Membran auch auf dem anderen Modul (z. B. Schutzmembran für Titrator) befinden kann, oder der Pipetten-Verschluß aus einer sich in der Probenmatrix nach wenigen Sekunden von selbst auflösenden Membran nach dem Prinzip entsprechender pharmakologischer Entwicklungen (z. B. aus einer nicht störenden Verbindung, wie Dextrin, Zucker, Salz o. ä.) besteht.

15. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß eine intelligente mikromechanische Ventilgebung und Steuerung dadurch entsteht, daß die einzelnen Funktions-Module der Schnell-Test-Anordnung mit oder ohne Gleitspacer, der zusätzliche Strömungskanäle und Umleitungen bilden kann, gegeneinander exakt kontrolliert verschiebbar sind, wodurch Verbindungen zwischen ihnen geschlossen oder geöffnet werden können.

16. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den parallel durchgeführten Titrationen der im Probenahme-Modul parallel gezogenen und genau bekannten und gleich großen Proben-Aliquote um mikrochemische Reaktionen mit bekannter Stöchiometrie in dazu geeigneten Mikro-Reaktoren im Titrations-Modul handelt, in denen die entsprechenden, genau bekannten Mikro-Äquivalente eines stabilen, mit dem Analyten selektiv reagierenden Reagenzes (Titrator) haltbar zusammen mit weiteren Hilfsreagenzien, wie geeigneter, selektiver Indikator(en), Puffersubstanzen, Maskierungsstoffe, Stabilisierer, Beschleuniger u. a., platziert sind und der Analyt-Titer pro benachbartem Mikro-Reaktor abgestuft graduell zu- oder abnimmt wobei bei Bedarf inkrementell noch Abstufungen unter 1 Promille vom Meßbereich möglich sind.

17. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikro-Reaktoren im Quantifizierungs- oder Titrations-Modul erst während der Durchführung des Schnell-Tests mit dem Probennahme-Modus, vorzugsweise mit Mikro-Pipetten bestückt, mit oder ohne Kapillar-Ansaugwirkung oder Mikro-Gas-Mäusen in Verbindung gebracht wird, wobei die so parallel und automatisch gezogenen, genau bekannten Proben-Aliquote mit oder ohne selektivitätserhöhende Mikro-Bioreaktoren im Vorbereitungs-Modul in die entsprechenden Mikro-Reaktoren mit genau bekanntem Titer überführt werden, wo sie mit der dort befindlichen Maßreagenz-Mischung chemisch und analyt-selektiv reagieren und der Äquivalenz-Punkt (Titrations-Endpunkt) leicht dadurch feststellbar ist, daß er gramm-äquivalenzmäßig zwischen den Mikro-Reaktoren liegt, zwischen denen eine geeignet gewählte optische Indizierung sich stark verändert (Indikatorumschlag) wobei analoge Vorgänge auch bei der Version mittels eines kontinuierlichen, kanalförmigen Titrations-Reaktors ablaufen und hier u. U. eine genauere Ablesung möglich ist, wenn der Indikator geeignet fixiert ist.

18. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß anstelle der konstant gehaltenen Proben-Aliquote im Probennahme-Modul dort eine simultane, Probennahme mit jeweils genau bekanntem, aber graduell zu- oder abnehmendem Pipettenvolumen durchgeführt wird und der genau bekannte Titer der Mikro-Reaktoren im

Titrationen-Modul konstant gehalten wird, wobei letzterer Modul in einer besonders preiswerten Papiertechnologie produziert wird und der Probenahme-Modus nach Durchspülen durch Proben-Injektion von wenigen mL wiederverwendet werden kann.

19. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß sowohl die bekannten Proben-Aliquote im Probennahme-Modus als auch die Titer im Titrations-Modul im Verlaufe der Serie von Mikro-Reaktoren gegenläufig verändert werden, was zu besonders großen Meßbereichen für Übersichtsmessungen führt.

20. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß sich die Anzahl der parallelen Mikro-Titrationen und die entsprechende gleichmäßige Abstufung der Graduierung maßanalytische Inkremente der in den Mikro-Reaktoren immobilisierten Titratoren im Titrations-Modul nach dem speziellen Anwendungsfall richtet und zwischen über 1000 und 1 (letzteres zur nicht-redundanten Überprüfung einer Grenzwert-Überschreitung) liegen kann.

21. Vorrichtung nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß speziell eng abgestufte Titrator-Graduierungen im Titrations-Modul zur genaueren Überprüfung von Toleranzbereichsgrenzen in zwei Analytkonzentrations-Bereichen vorgesehen werden und daß zur Erhöhung der statistischen Sicherheit bei der Schnell-Test-Überprüfung auf Einhaltung bestimmter Grenzwert vorzugsweise redundante Messungen durchgeführt werden, die dadurch ermöglicht werden, daß mit dem Probennahme-Modul unterschiedliche, aber genau bekannte Proben-Aliquote gezogen werden, die aber durch entsprechend veränderte Titer in den Mikro-Reaktoren im Titrations-Modul äquivalentmäßig kompensiert werden, so daß dies auf echte Parallel-Bestimmungen hinausläuft.

22. Verfahren und Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß nach diesem Verfahren einer mikrosystemtechnischen Mikro-Tüpfel-Platte bzw. "Linear-Titration" in engen Mikro-Kanälen zusätzlich zu der Gesamtsumme der maßanalytisch erfaßbaren Stoffe über Neutralisations-, Fällungs- oder Assoziations-(Antigen-Antikörper-Präzipitation), Komplexbildungs- oder Redox-Reaktionen auch alle die flüssigen oder gasförmigen Analyte kalibrationsfrei bestimmt werden können, für die eine traditionelle selektive, konzentrationsproportionale Indizierung und Quantifizierung in Form bekannter Schnell-Test-Kits oder im Rahmen klassischer Test-Stäbchen (Trockenchemie) und/oder Gasprüfröhrchen bereits bekannt ist, wobei diese Indizierung erfindungsgemäß aber hier nur zur Äquivalenz-Punkt-Feststellung herangezogen wird und als Titrator in den isolierten oder linearen kanalförmigen Mikro-Reaktoren ein Reagenz verwendet wird, daß den betreffenden Analyten selektiv und stöchiometrisch aus dem Lösungsgleichgewicht durch Komplexbildung, Fällungs-, Anbindungs- oder ähnlich wirkende Reaktionen entfernt (maßanalytisches Analyt-Abfangreagenz), so daß die traditionelle konzentrationsproportionale Indizierung (Anfärbung) der Trockenchemie erst nach Überschreiten des Äquivalenz-Punktes auftritt und letzterer über eine Intensitäts-Messung eine genauigkeitssteigernde Konzentrations-Extra-

polution ermöglicht.

23. Verfahren und Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß der erfindungsgemäßen Version mittels des Titrations-Mikro-Kanals im Titrations-Modul eine chromatographische Trennoperation dergestalt vorgeschaltet ist, daß die Stofftrennungen ebenfalls in engen gepackten oder ungepackten Mikro-Kanal-Säulen mit den üblichen stationären Phasen ablaufen, die oben mit einem lichtdurchlässigen Träger bedeckt werden, der die analytspezifischen Reagenzien für maßanalytische Analyt-Titration an der Stelle der Trennzone enthält, an der eine Auftrennung von den Störkomponenten stattgefunden hat, oder wo sie direkt im Anschluß an die stationäre Phase im Mikro-Kanal eingebracht sind, wobei die so markierte Strecke streng Konzentrationsproportional (z. B. Mikro-Äquivalent Analyt pro mm bis zum Farbumschlag) ist.

24. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß die planaren Mikro-Titrations-Arrays einschließlich der dazugehörigen Mikro-Pipetten auf einem flexiblen Substrat aufgebracht sind, welches beispielsweise aufgerollt und damit kompakt mit der Probe in Kontakt gebracht wird und zum Ablesen der betreffenden Analytkonzentration ausgerollt wird.

25. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß besonders preiswerte Schnell-Test-Anordnung aus flexiblen Substraten (Kunststoff-Folien, Papier, etc.) hergestellt werden, wobei die notwendigen Mikrostrukturen mit modernen Techniken der Präzisions-Massenproduktion, hier vorzugsweise mittels der Dickfilmtechnik über reproduzierbare Siebdrucke erzeugt werden, wobei die Titrations-Räume durch Ringe oder Kanäle aus einem flüssigkeitsundurchlässigen Material gestaltet werden, die mit unterschiedlichen oder gleichen Reagenz-Äquivalenten mittels Imprägnierung, Mehrfachdruck oder auch mittels automatisch arbeitender Dispenser gefüllt werden.

26. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß die Füllung der Mikro-Titrations-Kammern im Titrations-Modul mit einer graduell veränderten Menge einer geeigneten Standard-Reagenz-Mischung dadurch durchgeführt wird, daß die Mikro-Reaktoren mit entsprechend variierten Füll-Volumen hochpräzise hergestellt werden und bei der Herstellung bis zum Rand mit der verdickten Reagenzmischung aufgefüllt werden, wobei eine Schutzfolie eine natürliche Absperrung bilden kann und überschüssige Titrator-Mischung mittels einer durchsichtigen Bodenabdeckung abgestreift werden.

27. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß eine wiederverwendbare Multi-Mikro-Pipetten Anordnung mit variablen, genau bekannten Volumina dadurch erzielt wird, daß in einer keilförmigen Ausführungsform unterschiedlich lange und breite Kanäle untergebracht sind, die mittels dünner, mit einem geeigneten Spacer gefüllten Abdeckungen versehen sind, wobei zur Verbindung zweier benachbarter Pipettenkanäle auf beiden Seiten abwechselnd entsprechende Aussparungen im Spacer vorhanden sind, so daß die Multi-Vario-Mikro-Pipette von einer Seite komplett gefüllt werden kann und die Dosierung durch eine Verschiebung dieses Spacers, der

auch in Kombination mit anderen Modulen benutzt werden kann, mittels eines Hebels bewirkt wird, was die Mikro-Pipetten auf beiden Seiten öffnet.

28. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 27, dadurch gekennzeichnet, daß die Probenahme bei flüssigen oder gasförmigen Proben mittels Mikroventile, die die Kontaktzeit und damit die Zeit der Diffusion des Analyten durch die Reagenzschichten der Testanordnung kontrollieren, durchgeführt wird.

29. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 28, dadurch gekennzeichnet, daß ein ventilähnlicher Verschuß der Eintrittsöffnungen oder Kontaktzonen dadurch erzielt wird, daß eine quellfähige Substanz eine Sperrschicht bewegt oder selber bildet.

30. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 29, dadurch gekennzeichnet, daß das quantifizierende Titrations-Modul aus einem transparenten Material mittels einer stark vergrößernden Projektions-einrichtung ausgewertet wird, wobei die Codierung der Äquivalenz-Konzentrationen und auch der Analyt deutlich sichtbar angezeigt wird.

31. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 30, dadurch gekennzeichnet, daß sich durch eine geeignete Kombination von Funktions-Modulen und einer speziellen Gassammelvorrichtung des Prinzips "Passiv-Sammler" mit einem Array röhrenförmiger Gas-Diffusions-Strecken im Mikromaßstab eine Klasse neuartiger, tragbarer und hochgenauer Dosimeter für prinzipiell alle Schadstoffe wie z. B. Ozon, Kohlenmonoxid, Schwefelwasserstoff, Arsin, Phosphin, u. a. auch organischer Natur, Stoffe mit MAK-Werten ergibt und das Dosimeter jederzeit ohne Laborarbeit vom Träger ablesbar ist.

32. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 31, dadurch gekennzeichnet, daß im Vorbereitungs-Modul enzymbeladene Mikro-Bioreaktoren verwendet werden, die beispielsweise mit analyt-spezifische Oxidasen, Dehydrogenasen, Phosphatasen etc. beladen sind und die bei der Reaktion mit dem Analyten stöchiometrisch Stoffe freisetzen, wie beispielsweise Wasserstoffperoxid oder NADH oder Phenol, die einer maßanalytischen Redox-Titration im Titrations-Modul zugänglich sind.

33. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 32, dadurch gekennzeichnet, daß im Vorbereitungs-Modul immunologische Mikro-Bioreaktoren in Form von Affinitätsäulen verwendet werden, die analytselektive Antikörper oder entsprechende Antikörperfragmente kovalent gebunden enthalten und bei denen die Analyt-Bindungsstelle mit einem Analyt-Derivat abgesättigt ist, das a) eine niedrigere Affinitätskonstante als der Analyt aufweist und b) eine maßanalytisch erfaßbare Gruppe, vorzugsweise ein reversibles Redox-System (z. B. Ferrocen, Chinon/Hydrochinon, o. ä.) oder ein Enzym (ELISA-analog) enthält, das eine redoxaktive Substanz mit Hilfe eines Substrates erzeugt, was dann vom Analyten quantitativ aus der Bindungsstelle verdrängt wird, wodurch das markierte Analyt-Derivat in das Titrations-Modul transportiert wird und dort direkt oder im ELISA-Fall nach einer gewissen Reaktionszeit mit einem dort ebenfalls immobilisierten, geeigneten Substrat, hochgenau bestimmt werden kann.

34. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 33, dadurch gekennzeichnet, daß in einem geeigneten Titrations-Modul der Äquivalenz-Punkt mittels

elektrochemischer Indizierung über Leitfähigkeits, pH- oder redox-sensitiver Mikro-Elektroden in entsprechenden Mikro-Reaktoren angezeigt wird, wobei dazu dieses Modul in einen entsprechenden Auswerteleser gegeben wird, der die Elektrodenkontakte elektrisch mit einer Auswertungssoftware verbindet und dieses Modul nur dann verwendet wird, wenn die maßanalytische Reagenz-Mischung in einem anderen Modul mit dem Probenaliquot umgesetzt wird, wodurch es wiederverwendbar wird.

35. Verfahren und Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 34, dadurch gekennzeichnet, daß der Schnell-Test den chemischen Sauerstoffbedarf (CSB-Wert) zu ermitteln gestattet, wozu ein Probenahme-Modul mit oder ohne besondere Berücksichtigung von Grenzbereichen mit einem Titrations-Modul vereinigt wird und a) das letzte unterschiedliche Gramm-Äquivalenzen an stark saurem Kaliumdichromat (entsprechend dem DIN-Verfahren) sowie einen geeigneten Indikator enthält, oder b) ein weiteres Oxidations-Modul mit Mikro-Reaktoren mit Chromat-Überschuß enthält und letzterer nach vorgeschriebener Erhitzung in einem Trockenschrank durch Öffnen der Verbindungen, zum Titrations-Modul mit entsprechend gewählten Reduktions-Äquivalenten und unter Verwendung eines geeigneten Redox-Indikators "zurücktitriert" wird wobei die Erhitzungsstufe ggfs. auch mit dem Oxidations-Modul allein durchgeführt werden kann.

36. Verfahren und Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 35, dadurch gekennzeichnet, daß der Schnell-Test die Bestimmung des Total Organic Carbon (TOC) dadurch durchführt, daß neben dem Probenahme-Modul ein spezielles Oxidations-Modul eingeführt wird in dem die organischen Bestandteile der Probe durch starke Oxidationsmittel, wie Dichromat, Cer(IV), Wasserstoffperoxid plus UV-Licht, usw. bei einem geeigneten pH-Wert zu Kohlendioxid oxidiert werden und danach letzteres mittels einer gaspermeablen Membran in den Titrations-Modul überführt wird, wo es maßanalytisch als Hydrogencarbonat "titriert" wird.

37. Verfahren und Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 36, dadurch gekennzeichnet, daß alle für eine komplette Blut-, Serum-, oder Urin-Analyse wichtigen Analyte als Poly-Analyt-Anordnung mittels eines Verfahrens erfolgt, wo die Strecke einer Verfärbung (oder Streifenbreite) für die absolute Konzentration steht, was in einer speziellen Kombination des Probenahme-Moduls, das hierbei einen Kammeraufsatz mit Luer-Verschluß zur Proben-Injektion enthält, mit einem speziellen Reaktions-Modul, welches entweder nur Verbindungskanäle oder Mikro-Bio-Reaktoren für beispielsweise Glucose, Lactat u. a. enthält, wobei der Titrations-Modul mittels kontinuierlicher Titration in Präzisions-Mikro-Kanälen durch Diffusion in zwei Vorzugsrichtungen erfolgt, wodurch beispielsweise neben Glucose, Lactat u.w. auch die Elektrolyte über die Reagenzien der Trockenchemie und selektiven Komplexbildnern zuverlässig bestimmt werden.

Hierzu 8 Seite(n) Zeichnungen

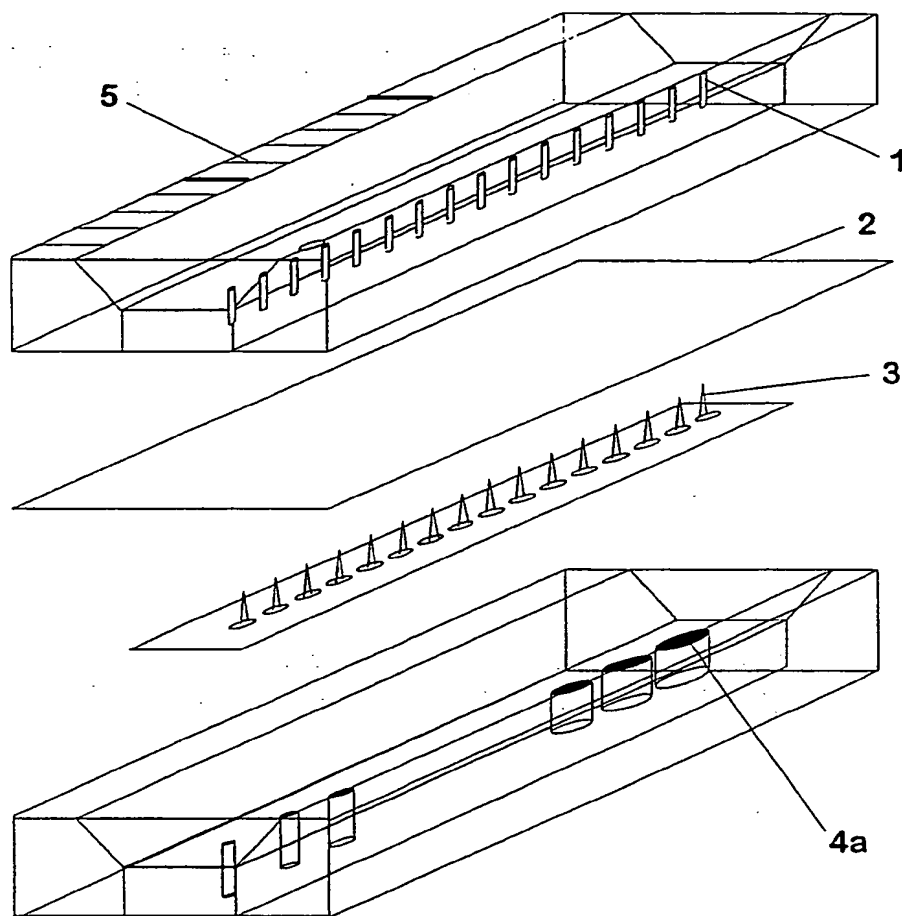


Abb. 1

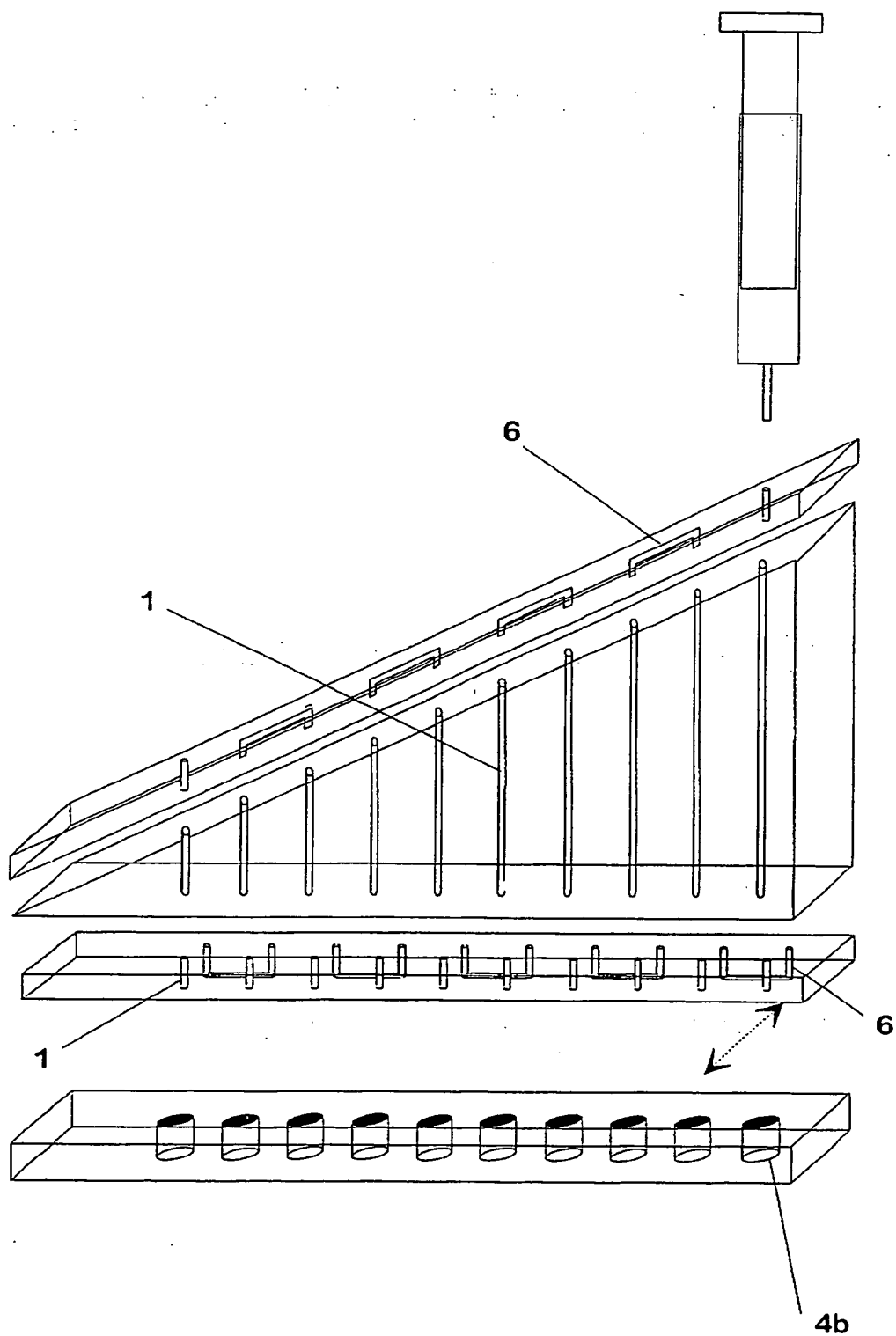


Abb. 2

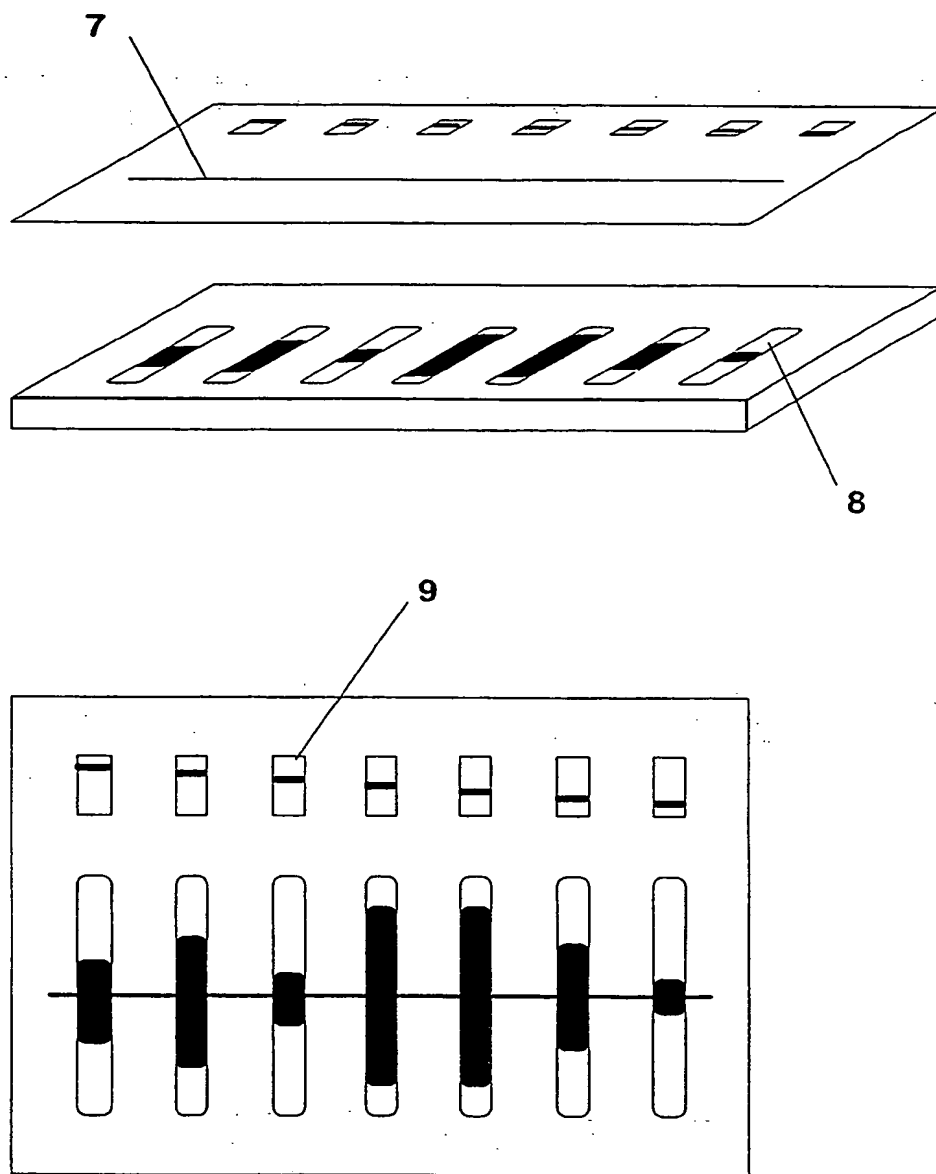


Abb. 3

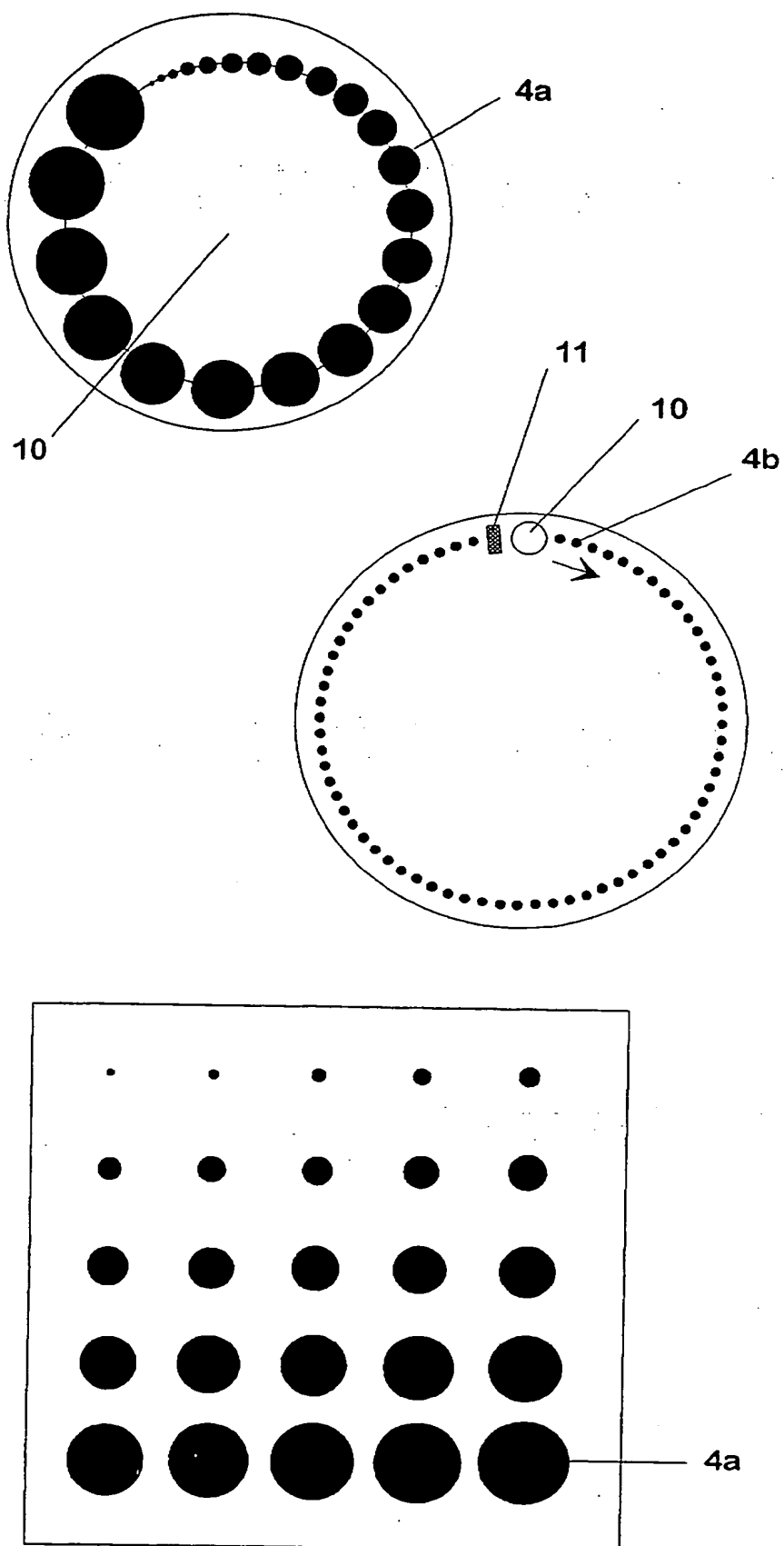


Abb. 4

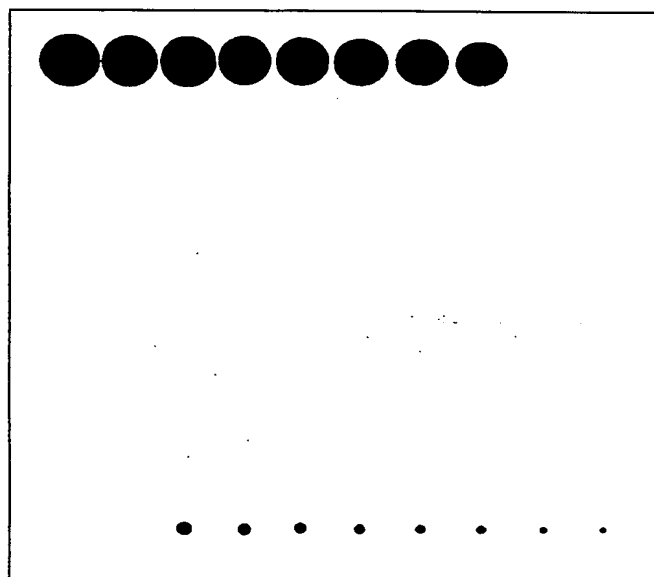
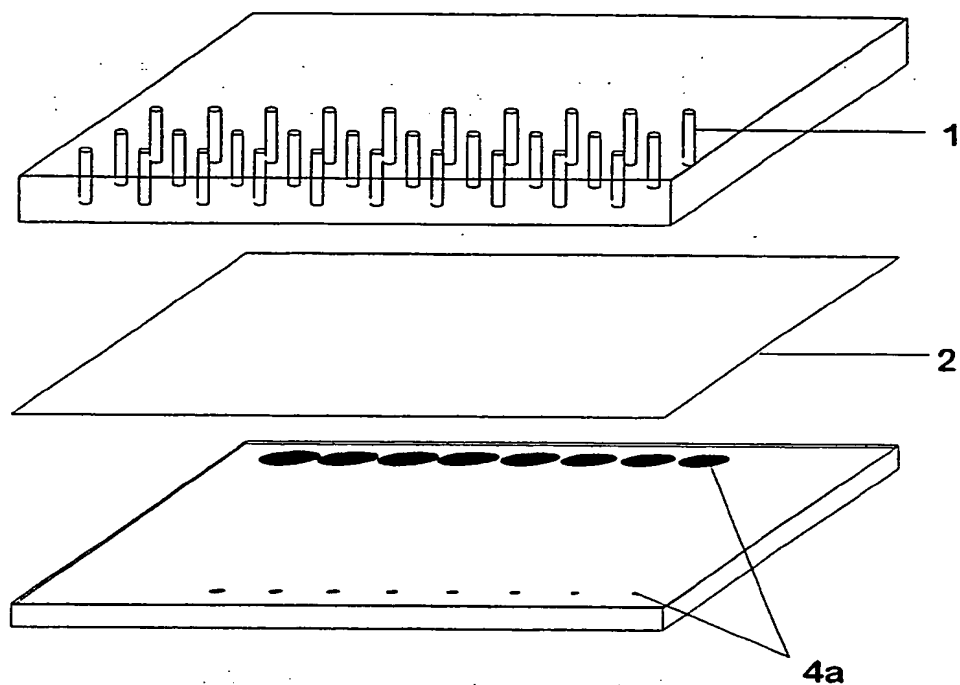


Abb. 5

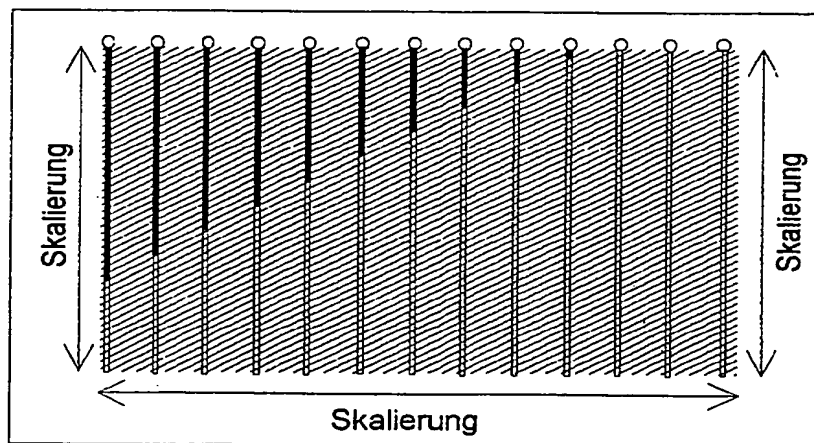
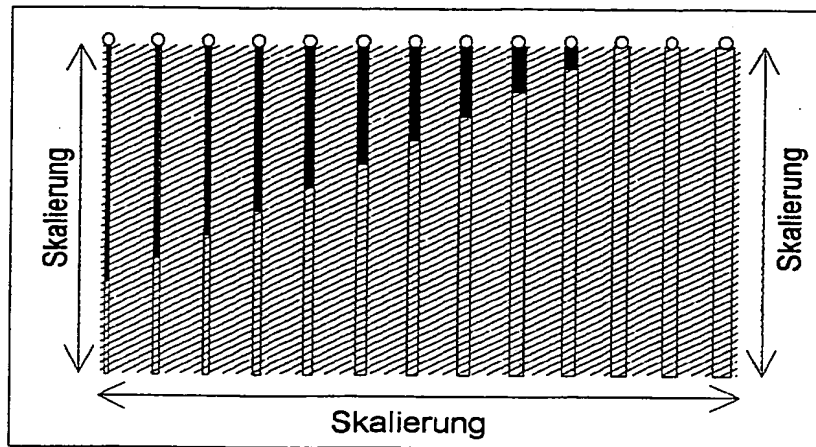


Abb. 6

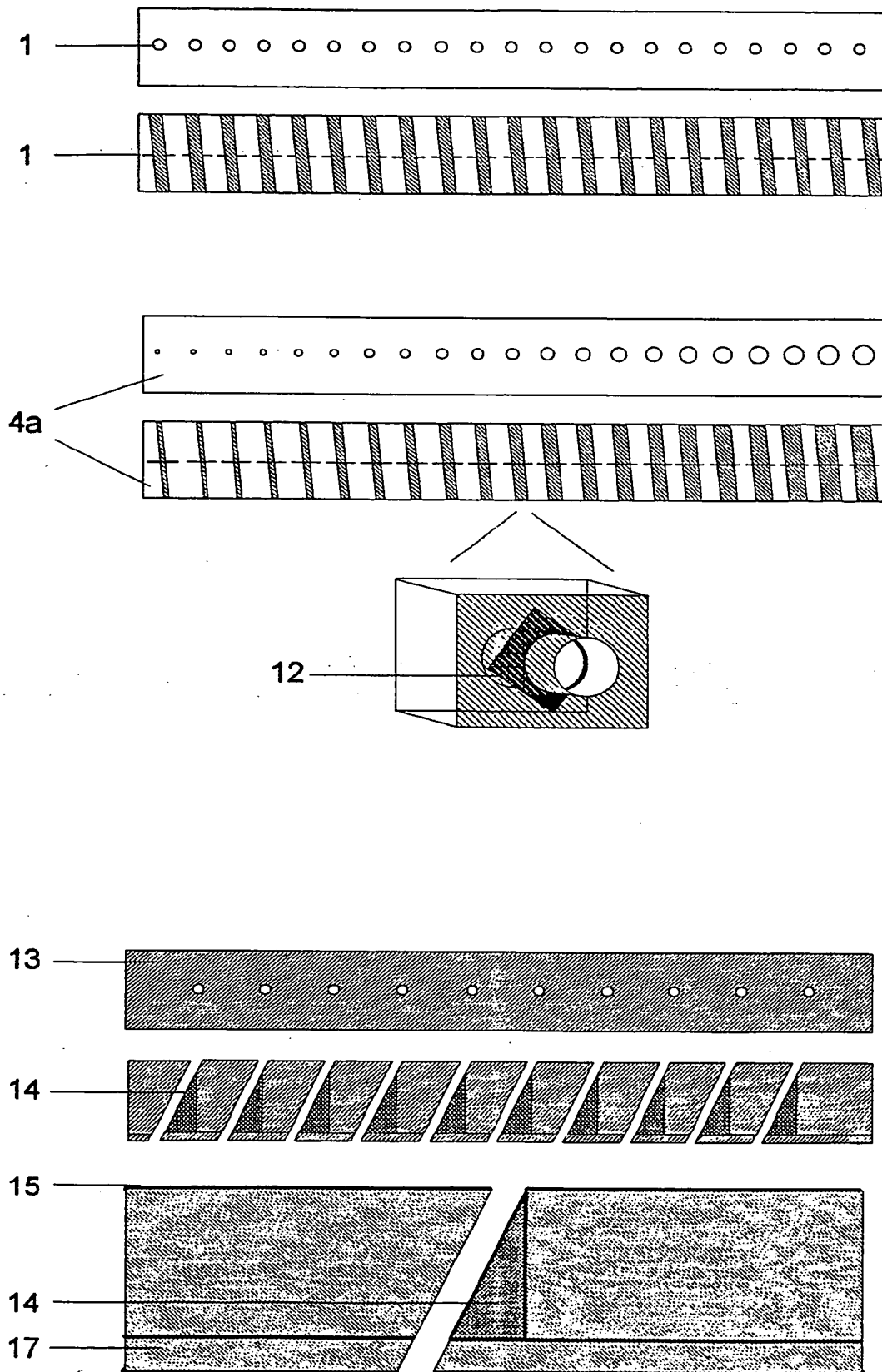


Abb. 7

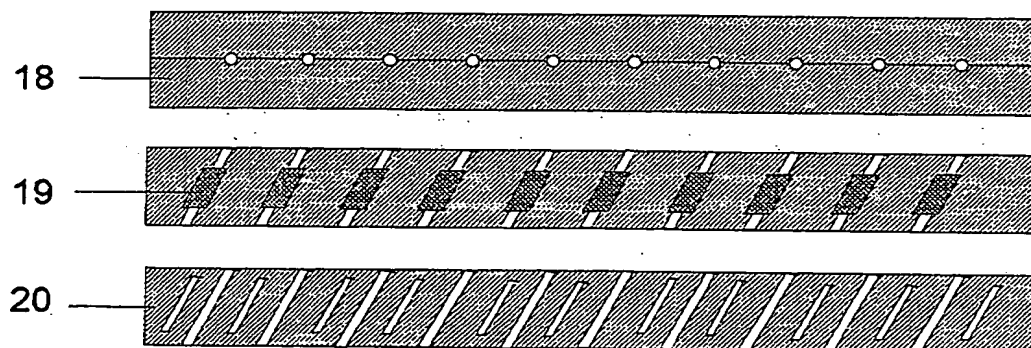


Abb. 8

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.